

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS



Biotechnológia a növénynemesítési alapanyagok előállításában,
a fitoremediációs fajok genetikai kontrolljában,
és a kultúrnövények archeogenetikai
stabilitásának meghatározásában

Gyulai Gábor

TÉZISEK

Szent István Egyetem
Genetika és Biotechnológiai Intézet
Gödöllő
2007

Tartalomjegyzék	oldal
Bevezetés és célkitűzés	4.
1. Irodalmi áttekintés	
1.1. In vitro klónozás és szelekció; biotechnológiai növénynemesítés.....	5.
1.2. Transzgénikus- és szelektált klónok alkalmazása a növényi fitoremediációban.....	5.
1.2.1. Fitoremediáció <i>gshI</i> -transzgénikus szürkenyár (<i>Populus x canescens</i>) klónokkal.....	6.
1.2.2. Transz/gén reaktiváció DHAC-indukált DNS-demetilációval.....	6.
1.2.3. Új mikroszatellita klóntípusok szelekciója feketenyárban (<i>Populus nigra</i>).....	6.
1.3. Régészeti genetika alkalmazási területei a növénybiotechnológiában.....	6.
2. Anyag és módszer	
2.1. In vitro klónozás és szelekció, biotechnológiai növénynemesítés	
2.1.1. Sejt eredetű klónok előállítása.....	7.
2.1.2. Páztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok.....	7.
2.2. Növényi fitoremediáció	
2.2.1. A <i>gshI</i> -transzgénikus szürkenyár klónok molekuláris stabilitása.....	7.
2.2.2. Új mikroszatellita klóntípusok szelekciója feketenyárban (<i>Populus nigra</i>).....	7.
2.3. Régészeti genetika	
2.3.1. Növényi anyag.....	7.
2.3.2. Molekuláris módszerek.....	8.
3. Eredmények és Megvitatás	
3.1. In vitro klónozás és szelekció a biotechnológiai növénynemesítésben	
3.1.1. Sziki mézpázsit (<i>Puccinellia limosa</i>) klónozása szomatikus embriogenezissel.....	9.
3.1.2. Vadgesztenye (<i>Aesculus hippocastanum</i>) klónozása járulékos embriogenezissel.....	9.
3.1.3. A szója (<i>Glycine soya</i>) klónozása szomatikus embriogenezissel.....	10.
3.2. Növényi fitoremediáció	
3.2.1. A 35S- <i>gshI</i> -transzgénikus nyár (11ggs, 6lgf) klónstabilitásának meghatározása.....	10.
3.2.2. Transz/gén reaktiváció DHAC-indukált DNS-demetilációval.....	11.
3.2.3. Új mikroszatellita klóntípusok azonosítása feketenyárban (<i>Populus nigra</i>).....	12.
3.3. Kulturnövények archeogenetikai stabilitása	
3.3.1. A köles (<i>Panicum miliaceum</i>) genomstabilitása a középkor óta.....	13.
3.3.2. A sárgadinnye (<i>Cucumis melo</i>) mikroszatellita diverzitása.....	14.
3.3.3. A görögdinnye (<i>Citrullus lanatus</i>) archeogenetikai jellemzése.....	15.
4. Új tudományos eredmények - A gyakorlati alkalmazás lehetőségei	17.
5. Irodalomjegyzék	18.
6. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	21.
Köszönetnyilvánítás	24.

Bevezetés és célkitűzés

(a) In vitro klónozás és szelekció, biotechnológiai növénynemesítés

A Mendel-i genetikát megelőző klasszikus növénynemesítés legfontosabb eszköze az előnyösebb tulajdonságokra történő *szelekció* volt. Ezt követte az első természetes *fajhibrid* a búza-rozs, triticale, azonosítása, illetve előállítása, majd a közeli- és távoli *fajhibridizációs* munkák. A Morgan-i (1910) kromoszóma-genetika és a γ -sugárzással végzett indukált mutációs genetika módszereit alkalmazó *mutációs növénynemesítés* napjainkban is alkalmazott módszere a genetikai variabilitás növelésén keresztül nemesítési alapanyag-előállításnak. Ezt a módszert követte a *poliploidizációs* nemesítés, az őszi kikerics (*Colchicum autumnale*) hatóanyagának a kolchicin-nek az alkalmazásával. A biotechnológiai növénynemesítésnek köszönhető a *sejt-eredetű klónok* alkalmazása. Ennek a módszernek legfontosabb technikai eredménye a Fe-kelát (Na_2EDTA), valamint a növényi hormonok, elsősorban az auxinok és a citokininek in vitro alkalmazása volt, amely kiküszöbölte a kloróvizot, és lehetővé tette a nagyszámú szintetikus táptalaj alkalmazását a növényregenerálásban.

Munkám során egy- és kétszikű fajok egysejt-eredetű klónozása és az egy-sejt eredet pásztázó (szkenning) elektron mikroszkópos igazolása volt a cél sziki mézpázsitban (*Puccinellia limosa*) (Jekkel, Gyulai, Heszky 1995), vadgesztenyében (*Aesculus hippocastanum*) (Jekkel, Gyulai et al. 1998) és szójában (*Glycine soya*) (Gyulai et al. 1993a). További fajok elemzésére, helyszűke miatt, csak utalok: tarackbúzában (*Agropyron repens*) és zöld pántlikafűben (*Phalaris arundinacea*) (Gyulai et al. 2003); valamint az ivarsejt eredetű, dihaploid paprika (*Capsicum annuum*) (Gyulai et al. 2000) klónokban.

(b) Növényi fitoremediáció

A fitoremediáció során a növények tápanyagfelvevő mechanizmusát használjuk fel a talajt szennyező anyagok akkumulációjához. Néhány egymást követő növekedési periódus után a föld feletti biomasszát begyűjtve a szennyezés eltávolítható a területről. Az elégetés után a hamuban tovább koncentrálhatjuk a szennyezőanyagokat, amelyek így újrahasznosíthatók, vagy speciális hulladéktárolókban helyezhetők el.

A fitoremediációs céllal előállított transzsgénikus, glutation-túltermelő *gshI*-szürkenyár (*Populus x canescens*) növények több mint egy évtizede in vitro tenyészetben fejlődtek, ezért szükséges volt igazolni a *gshI* transzgén jelenlétét (Gyulai et al. 2005), nehézfém felvételi kapacitását (Gyulai et al. 2005) és aktivitását (expresszióját) (Bittsánszky, Gyulai et al. 2006), valamint DNS-demetilezőszerrel (DHAC) történő génexpresszió növelését (Gyulai 2007, 2008; Bittsánszky, Gyulai et al. 2007ab).

A hazai vegetációs körülmények között a feketenyár (*Populus nigra*) nagyobb fitoremediációs kapacitással rendelkezik, mint a szürkenyár, ezért haploid eredetű (n) feketenyár populációban új mikroszatellita genotípusú klónszelekció elvégzése volt a cél (Bittsánszky, Gyulai et al. 2007b), egyben kísérletes igazolását nyújtani a haploid indukció során végbement gametoklonális variabilitás molekuláris fixálásának.

(c) Régészeti genetika

A régészet a 80-as évek közepéig úgy gondolta, hogy csak a biokémiaiilag stabilabb molekulák, mint pl. a lignin állhat ellent az élőlény pusztulását követő lebomló folyamatoknak, míg a DNS, teljes pusztulása miatt nem vizsgálható. 1984 óta ismert, hogy a DNS az idő múlásával ugyan bomlásnak indul, azonban szerencsés körülmények, (alacsony hőmérséklet, gyors kiszáradás, magas sókoncentráció, illetve száraz mumifikáció) kevésbé degradálódik, lehetőséget biztosítva ezzel az ősdNS-vizsgálatához. Mindezzel egy új tudományterület az archeogenetika született meg alig húsz évvel ezelőtt, nem véletlenül a PCR-módszert kifejlesztő Cetus (USA) vállalat laboratóriumában (1984).

A növényi régészeti genetika legfontosabb területe a termesztett növények domesztikációjának és evolúciójának, valamint a mezőgazdaság kialakulásának és elterjedésének a nyomon követése elsősorban magmaradványok ősdNS mintáinak elemzésével. A mezőgazdálkodás eredete az utolsó jégkorszak végétől (i.e. 11.000 év) származtatható, amikor a halászó-vadászó törzsek, később a pásztor népek megkezdheték a növénytermesztést először talán a Termékeny Félhold (Mezopotámia, Assíria, Fönícia és Egyiptom) területén, valamint a Jordán folyó északi völgyében (Ohalo II), ahol 20.000 éves vadárpa (*H. spontaneum*) és búza (*Triticum dicoccoides*) leletek kerültek elő napjainkban. A Dél-Kóreában feltárt 15.000 éves rizs lelet, illetve a vietnami Hoabinh-i vadászó-halászó kultúrának a mai Thaiföldre kiterjedő számtalan növényleletei (ld. a Lélek barlangi ásatások) az i.e. 9.000 – 5.500 évekig követhetők nyomon.

Vizsgálataimmal a hazai növényi archeogenetikában elsőként foglalkoztam köles (*Panicum miliaceum*) (Gyulai et al. 2006; Lágler, Gyulai et al. 2005), sárgadinnye (*Cucumis melo*) (Szabó, Gyulai et al. 2005) és görögdinnye (*Citrullus lanatus*) (Tóth, Gyulai et al. 2007) több száz éves magleleteiből izolált ősdNS elemzésével, ezen keresztül a fajok mikroevolúciójával és fajtarekonstrukciójával.

1. Irodalmi áttekintés

1.1. *In vitro* klónozás és szelekció, biotechnológiai növénynemesítés

Klónoknak egy egyed ivartalanul előállított, ezért azonos genetikai állományú utódait nevezzük (a klón jelentése: ág, a kladon görög szóból; ld. további jelentését: klán). Napjainkban az állat és humán tudományokban kapott szerepet, ld. a humán klónozási, és az emlős (juhok) Dolly kísérleteket (Briggs, King 1952; Wilmut et al. 1997). A módszer azonban eredetileg a növényi alkalmazásból indult ki (ld. szemzés, oltás, bújtas, dugvány) és fejlődött ki a vírusmentes növényi szaporítóanyag (Morel, Martin 1952; Maróti 1976), illetve a biotechnológiai (Haberlandt 1902, 1913; Ereky 1919; Orsós 1941; Fári, Kralovánszky 2006) úton előállított, egysejt-eredetű szomatikus embriófejlődésen keresztül történő klónok előállításáig (Larkin, Scowcroft 1981).

A Mendel-i genetikát (Mendel 1865) megelőző klasszikus növénynemesítés legfontosabb eszköze az előnyösebb tulajdonságokra történő *szelekció* volt. Ezt követte az első természetes *fajhibrid* a búza-rozs, tritcale, (*Triticum aestivum* x *Secale cereale*) azonosítása, illetve előállítása a múlt század végi Angliában (Skócia 1875) és Németországban (1988) (a *Triticale* név nyomtatásban először csak 1935-ben jelent meg) (in Villareal et al. 1990). A természetes fajhibridek azonosítását (Digby 1912), az első jól dokumentált mesterséges fajhibrid a retek-káposzta (rafanobrasszika - *Raphanus sativus* x *Brassica oleracea*) előállítása (Karpechenko 1927) követte, a napjainkig folyó közeli- és távoli *fajhibridizációs* munkákkal.

A Morgan-i (1910; Nobel díj 1933) kromoszóma-genetika és γ -sugárzással végzett indukált mutációs genetika (Muller 1927; Nobel díj 1946) módszereit alkalmazó *mutációs növénynemesítés* napjainkig alkalmazott módszere a genetikai variabilitás növelésén keresztüli nemesítési alapanyag előállításnak (Bálint 1996).

A poliploid nemesítés az őszi kikerics (*Colchicum autumnale*) hatóanyagának a kolchicin-nek az alkalmazásával kezdődött (Nebel, Rattle 1938; Barnabás et al. 1999).

A sejt-eredetű klónok alkalmazását a biotechnológiai növénynemesítés vezette be, melynek végső elméleti igazolása Larkin és Scowcroft (1981) nevéhez fűződik. Ennek a módszernek legfontosabb technikai részlete a Fe-kelát (Na_2EDTA), valamint a növényi hormonok, elsősorban az auxinok (Paál 1918) és a citokininek (Haberlandt 1913; Overbeek et al. 1941; Miller et al. 1955) *in vitro* alkalmazása volt, amely kiküszöbölte a klórozist, és lehetővé tette a nagyszámú szintetikus táptalaj alkalmazását a növényregenerálásban (Murashige, Skoog 1962; Gyulai et al. 1992abc, 1993, 1995abc; Toldi, Gyulai et al. 1994, 1996). A haploid (n) ivarsejt, és a diploid (2n) testi sejtéből történő embriógenézis (haploid-, és szomatikus embriógenézis) egysejt-eredetének bizonyításával nagy mennyiségű klón, új genotípusú növénynemesítési alapanyag előállítása vált lehetővé (Fári 1982; in Dudits, Heszky 2000, 2003; in Heszky et al. 2005).

Munkám során egy- és kétszikű fajok klónozása volt a cél (Gyulai et al. 1993abc, 1997, 1999a; 2003ab, 2004; Mester, Gyulai et al. 1998; Kiss E et al. 2004; Janowszky, Gyulai et al. 1998), valamint az egysejt-eredet szkennning elektron mikroszkópos bizonyítása, különös tekintettel a sziki mézpázsitban (*Puccinellia limosa*) (Jekkel, Gyulai, Heszky 1995); vadgesztenyében (*Aesculus hippocastanum*) (Jekkel, Gyulai et al. 1998) és szójában (*Glycine soya*) (Gyulai et al. 1993abc). További fajok elemzésére, helyszűke miatt csak utalok: tarackbúzában (*Agropyron repens*) (Gyulai et al. 1995abc; Tárczy, Gyulai et al. 1996; Hangyelné, Gyulai et al. 1996; Mázik-Tőkei, Lelley, Gyulai et al. 1997), és zöld pántlikafűben (*Phalaris arundinacea*) (Gyulai et al. 2000a, 2003b); valamint az ivarsejt eredetű, dihaploid paprika (*Capsicum annuum*) klónokban (Gyulai et al. 1999ab, 2000b; Gémesné et al. 2000, 2001).

1.2. *Transzgénikus és szelektált klónok alkalmazása a növényi fitoremediációban*

A fitoremediáció olyan technikák és technológiák összefoglaló neve, amelyek a talajok méregtelenítését (re-mediálását) növények alkalmazásával végzi (fitoextrakció), pl. vegyiművek zagytaivainak tisztítását, olajszenyezések megszüntetését, illetve a katasztrófa területek (pl. Csernobil) helyreállítását (Kőmíves et al. 1998, 2003; Gyulai et al. 2005; Simon 2004).

A fitoextrakció során, a növények tápanyagfelvő mechanizmusát használjuk fel a szennyezőanyagok akkumulációjához, *in vivo* és *in vitro* (Purnhauser, Gyulai 1993; Zsoldos et al. 2003). Néhány egymást követő növekedési periódus után a föld fölötti biomasszát begyűjtve a szennyezés eltávolítható a területről. A elégetés után a hamuban tovább koncentrálnak a szennyezőanyagokat, amelyeket így újrahasznosíthatunk, vagy speciális tárolókban helyezhetünk el.



1. ábra. A feketenyár (*Populus nigra*) természetes nehézfémtűrőse: felhagyott bauxitbányák (Gánt) úttörőfaja (Bittsánszky, Gyulai et al. 2005b) (Fotó: Gyulai Gábor Zsigmond).

Fitoremediációra azok a növények alkalmasak, amelyek képesek a szennyezőanyagok által okozott stressz tűrésére, a szennyezőanyagok nagy mennyiségben történő felvételére, és a föld feletti szövetekben történő akkumulációra. A *Populus* fajok alkalmassága a fitoremediációra nem vitatható (Gullner, Gyulai et al. 2005), ültetésük egyszerű, növekedésük gyors (4-5 m/év) (Gencsi, Vancsura 1992; Kevey 1999; Bordács et al. 2002; Mátyás 2006), magas a transpirációs rátájuk, mély gyökérzetük miatt elérik a talaj mélyebb rétegeit, könnyen adszorbeálják, lebontják és/vagy detoxifikálják a szennyezőanyagokat, miközben gátolják a talajeróziót (ld. meddőhányók, felhagyott bauxitbányák természetes úttörőfaja) (1. ábra).

1.2.1. Fitoremediáció a 35S-gshI-transzgénikus szürkenyár (*Populus x canescens*) klónokkal

A glutation (GSH) antioxidáns hatása (Galiba et al. 2002) hívta életre az antioxidánsokat kódoló génekkel történő transzformációs kutatásokat, melyek a hosszú életidejű évelő és fás növényeknél különösen nagy jelentőségűek. A nyárfa glutation anyagcseréjében történő stabil genetikai módosításhoz az INRA 717-1-B4 jelű *Populus x canescens* klónok kerültek felhasználásra a szürkenyár fitoextrakciós kapacitása, valamint a szürkenyár előnyös *Agrobacterium tumefaciens* szembeni fogékonysága miatt. A transzformációk célja minden esetben a növényi redukált glutation tartalom növelése volt. A szürkenyár klónokat az *Escherichia coli* baktériumból származó γ -glutamil-cisztein szintáz (γ -ECS) enzimet kódoló génnel (*gshI*) transzformálták (Leple et al. 2000). Kétféle *gshI*-génnel transzformált klóntípust sikerült előállítani. A 11ggs klónban a transzgén fehérjeterméke a citoszolban expresszálódik (Arisi et al. 1997). A 6lgl klónban a CaMV-35S promóter és a *gshI* gén közé beépített borsóból klónozott RUBISCO gén kis alegységének tranzit peptid génjét építették be (borsó *rbcS*), ezért a *gshI* gén terméke beszállítódik a kloroplasztisba (Noctor et al. 1998). Kutatásaimhoz mindkét klónt alkalmaztam (Gyulai et al. 2005).

1.2.2. Transz/gén reaktiváció DHAC-indukált demetilációval

A legstabilabb transz/gén konstrukciók is ki vannak téve a gén-csendesítés (*gene silencing*) hatásának, amely elsősorban a DNS metilációján keresztül megy végbe a DNS metiltranszferáz enzim (CMT) katalízisével. A DNS citozin nukleotidjának metilációja 5-metilcitozinná (5-mC) egyben a növények természetes molekuláris védekezési mechanizmusa. A CMT-inhibitor kezelésnek kitett növényekben a metilációs szint csökken, új metilációs mintázat, valamint elhallgattatott gének reaktivációja megy végbe. Vizsgálatainkban ezért a transz/gén reaktivációban hatékonynak bizonyult, DNS metiltranszferáz (CMT) enzim gátlásán keresztül ható, vizes közegben is stabil, DHAC (5,6-dihidro-5'-azacitidin hidroklorid) (Cao et al. 2000) indukciót alkalmaztuk a 11ggs és 6lgl *gshI*-transzgénikus nyárfaklónokban, valamint a nem-transzformáns klónban. A *gshI* gén (és a kapcsolódó endogén nyárfagének: *gsh1*, *gst* gének) aktivitásának mérésére reverz transzkripció kuantitatív PCR-t (qRT-PCR) alkalmaztunk. A DHAC-indukált *gshI* gén reaktiváció végső célja egy alternatív lehetőség kidolgozása volt a transzgénikus *gshI* nyárfaklónok kiváltására (Bittsánszky, Gyulai et al. 2007; Gyulai 2007; Gyulai et al. 2008).

1.2.3. Új mikroszatellita klóntípusok szelekciója feketenyárban (*Populus nigra*)

A feketenyár (*Populus nigra*) hazánk őshonos fafaja. Elsősorban a folyók mentén, ártereken, időszakos vízborítottságú réti- illetve lápi talajok, valamint tápanyagban gazdagabb homok- és vályogtalajokon fejlődik a legjobban. A génmegőrzési programok kiemelt faja, mert Magyarországon a fekete nyárat nagy mértékű genetikai szennyezés, az átporzásos klónok felszaporodása (ld. a későn fakadó nyárt *Populus x euramericana*, amely a feketenyár -termős- és az amerikai (*Populus deltoides*) -beporzó- természetes hibridje, amely a 18. század közepe táján jöhetett létre). Ez tette szükségessé a tiszta vonalú feketenyár-egyedek felkutatását, összegyűjtését és szintetikus állományokban való elhelyezését (Mátyás 2006). A kutatásaim célja új mikroszatellita genotípusú (Kiss J et al. 2001) feketenyár klónok molekuláris azonosítása volt egy végső fitoremediációs alkalmazásra.

1.3. Régészeti genetika alkalmazási területei a növénybiotechnológiában

A természettudományok egyik legújabb területe az archeogenetika. A PCR-eljárás (1983) felfedezésének (1993-as kémiai Nobel díj, KB Mullis) eredményeként (Saiki et al. 1985, Mullis et al. 1986; Mullis, Faloona 1987) alig két évtizedes múltat tekint vissza, éppen a PCR-módszert kifejlesztő Cetus (USA) vállalat laboratóriumában megszületett első (quagga-ló) ősdns vizsgálati eredményekkel (Higuchi et al. 1984). Az európai iskola (svéd) az egyiptomi múmia kutatásokkal (Pääbo 1985), illetve (B. Sykes laborja, Anglia) az első sikeres csontból történő DNS kivonással (Hagelberg et al. 1989) kezdődött. A magyar iskola napjainkban indult részben humán (Kalmár et al. 2000; Fletcher et al. 2003; Bogacsi-Szabó et al. 2006; Mende 2006), részben növényi archeogenetikai kutatásokkal (Lágler, Gyulai et al. 2005, 2006, 2007; Szabó, Gyulai et al. 2005ab, 2006, 2007; Gyulai et al. 2006).

2. Anyag és módszer

2.1. *In vitro* klónozás és szelekció, biotechnológiai növénynevelés

2.1.1. Sejt eredetű klónok előállítása.

A szövettenyésztési klónszelekció során steril mag eredetű embriógén kallusz tenyészeteket indítottunk sziki mézpázsitban (*Puccinellia limosa*) (Jekkel, Gyulai, Heszy 1995); tarackbúzában (*Agropyron repens*) (Gyulai et al. 1995abc; Tárczy, Gyulai et al. 1996; Mázik-Tőkei, Lelley, Gyulai et al. 1997); zöld pántlikafűben (*Phalaris arundinacea*) (Gyulai et al. 2003ab); szójabab (*Glycine soya*) (Gyulai et al. 1993a) és vadgesztenyében (*Aesculus hippocastanum*) (Jekkel, Gyulai et al. 1998). A tenyészeteket MS (Murashige, Skoog 1962), valamint F6 (Gyulai et al. 1992a) táptalajon indukáltuk 28 napi inkubációval, növényi hormonok alkalmazásával (Gyulai et al. 1995a).

2.1.2. Páztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok.

A morfológiai elemzéshez a mintákat glutaraldehydben fixáltuk (5% w/v foszfát pufferben 0.7 M oldva, pH 7.2), acetonekoncentráció sorban (10-50-70-90-100%) deszikkáltuk, CO₂-kririkus ponton szárítottuk, aranygőzzel (30 nm) fedtük (Blazers CDC 020), majd TESLA BS-300 szkennelési elektron mikroszkóppal végeztük az elemzést (Gyulai et al. 1993a).

2.2. Növényi fitoremediáció

2.2.1. A *gshI*-transzgenikus szürkenyár klónok molekuláris stabilitása:

A két *gshI*-transzformáns klónt a 6lgl (Noctor et al. 1998), és a 11ggs (Arisi et al. 1997), valamint a nem-transzformáns (X) kontroll klónt *in vitro* hajtástenyésztésben WPM (Woody Plant Medium) táptalajon szaporítottuk fel, majd tözeget talajban természetes fényen neveltük.

A *gshI* transzgen stabilitásának kimutatása: A transzformált szürkenyár klónokba bevitt *E. coli gshI* transzgen (# X03954) valamint a konstrukcióban szereplő karfiolmozaik vírus 35S promótere, és a 6lgl klónba beépített borsó (*Pisum sativum*) RUBISCO kis alegységének tranzitpeptidje (borsó *rbcS*, # M25614) jelenlétének bizonyítására primer-párokat terveztünk és alkalmaztunk. A PCR reakcióhoz totál DNS-t izoláltunk (ld. alább). A kísérletekhez egyedeket vizsgáltunk, klónonként öt ismétlésben. A primereket a szekvenciaadatokból Primer3 programmal (Rozen, Skaletsky 1997) terveztük. A reakciókat Perkin Elmer 9700 Thermocycler készülékben végeztük (Gyulai et al. 2005). A *gshI* transzgen expressziójának kimutatása: A szürkenyár klónokba épített transzgen expressziójának bizonyítására végzett qRT-PCR reakcióhoz a klónokból (11ggs, 6lgl és a kontroll) totál RNS-t izoláltunk, abból cDNS-t készítettünk (Fermentas #K1622) (Györgyei et al. 1991; Páy et al. 1992; Fehér et al. 2003). A kísérletekhez egyedeket vizsgáltunk, klónonként három ismétlésben. A cDNS-t templákként használva PCR reakciókat indítottunk a *gshIab* primerpárral (Bittsánszky, Gyulai et al. 2006).

Klónstabilitás meghatározása *aFLP* módszerrel: A szürkenyár klónokból (11ggs, 6lgl, kontroll) totál DNS-t izoláltunk, klónonként 10 egyedből, a DNS mintákból klónonként 10-10 egyedből bulk-ot hoztunk létre (Michelmores et al. 1991). A klónok stabilitását *aFLP* (fluorescent amplified DNA fragment length polymorphism) eljárással vizsgáltuk (Vos et al. 1995) módszere alapján módosításokkal (Cresswell et al. 2001; Skot et al. 2002; Gyulai et al. 2005) a DNS mintákból létrehozott bulk-okon. Az emésztéshez és ligáláshoz az *EcoRI*-*MseI* restrikciós endonukleázokat használtuk. DNS metiláció gátlása DHAC-kezeléssel: A steril növények leveleiből 9 mm átmérőjű levélkorongokat vágunk (Bittsánszky, Gyulai et al. 2006; Gyulai et al. 2005), majd DHAC-t (5,6-dihidro-5'-azacitidin hidroklorid) tartalmazó (10⁻⁴ M) táptalajra helyeztük (Gyulai et al. 1995a, 2005; Gullner, Gyulai et al. 2005), és inkubáltuk 7 napig, 16h/8h világos/sötét (40 μEm²s⁻¹) megvilágítás mellett (Bittsánszky, Gyulai et al. 2005ab).

2.2.2. Új mikroszatellita klóntípusok szelekciója feketenyárban (*Populus nigra*).

A feketenyár klónok (*Populus nigra*) mikroszatellita elemzéséhez portok eredetű, szabadföldön nevelt feketenyár (*P. nigra*) növényeket (Kiss J et al. 2001) alkalmaztunk, összesen 35 klónt mikroszaporítottunk (Mészáros et al. 1999), melyek közül 29 (1-29 klónok) az N-SL klónról származott (30. anyató); 6 klón pedig (31-36) az N-309 (37.) klón utódai voltak (Gyulai et al. 2005; Bittsánszky, Gyulai et al. 2005ab; 2006; Bittsánszky 2006; Gullner, Gyulai et al. 2005). A mikroszatellita polimorfizmus vizsgálatához cy5-jelölt (Röder et al. 1998) SSR primer párokat alkalmaztunk. A fragmentum elemzést ALF eljárással (ld. alább) végeztük.

2.3. Régészeti genetika

2.3.1. Növényanyag.

Összehasonlító mai növényfajták: A régészeti köles (*Panicum miliaceum*) fajtaköri besoroláshoz 20 mai köles tájfaját kispárcellás kísérletben (5 x 5m) vizsgáltunk két ismétlésben, majd a Tápiószélei Agrobotanikai Intézet és az OMMI felvételezési szempontjai alapján 28 morfológiai tulajdonság szerint hasonlítottuk össze (Lágler, Gyulai et al. 2005). A sárgadinnye (*Cucumis melo*) lelet fajtaköri besorolásához, és fenotípus rekonstrukciójához 47 mai tájfaját és termesztett fajtát vizsgáltunk 23 morfológiai tulajdonság alapján (Szabó, Gyulai et al. 2005ab). A görögdinnye (*Citrullus lanatus*) leletek fajtaköri besoroláshoz 44 mai tájfaját és termesztett fajtát vizsgáltunk 25 morfológiai tulajdonság alapján (Tóth, Gyulai et al. 2007). A 15. századi növényminták. A Budai királyi vár (Árpád-házi IV. Béla

Király, 1243) Zsigmond-kori szárnyának (15. sz. eleje), régészeti feltárása (1999) során (Budapest I. Ker.) kerültek felszínre (Bacsó et al. 2004; Bisztray et al. 2004a,b; Bodor et al. 2004). A 15. századi debreceni görögdinnye lelet, a volt Kölcsey Művelődési Központ területén feltárt kutak növényanyaga (Gyulai F anyaga). A 18. századi görögdinnye lelet botanikai gyűjtemény anyaga, az un. Pannonhalmi Apátság botanikai gyűjteményéből bocsátották rendelkezésre (Mezőgazdasági Múzeum, Budapest). A 4. századi köles minta mongóliai (3. sír, Darhan, Mongolia, 1969) feltárából származik (Tseveendorj, Sugar 1994).

2.3.2. Molekuláris módszerek

DNS-izolálás: A genomikus DNS kivonásához az SDS-el kiegészített Nucleon PhytoPure kit-et (Amersham) alkalmaztuk. Az RT-qPCR elemzéshez totál RNS-t 0,05 g tömegű levélkorongokból izoláltunk (Gyulai et al. 2005, 2008, Gyulai 2007; Bittsánszky, Gyulai et al. 2005ab, 2006) Absolutely RNA Miniprep Kit-tel (# 400800, Stratagene, USA - Biomedica, Hungary)..

Az egyszálú cDNS-t az mRNS templáton reverz transzkripcióban oligo(dT)18 primer alkalmazásával végeztük (Fermentas # K1622) a gyártó eljárását követve. A transzgén-gshI (*E.coli*), nyár-gshI (*Populus x canescens*) gének expressziós szintjét qPCR elemzéséhez DyNAmo HS SybrGreen I qPCR Kit-et (F-410L, Finnzymes) alkalmaztunk. Belső kontrollnak a konstitutívan expresszálódó α -tubulin gént használtuk.

Kiértékelés. A relatív kvantifikálás adatelemzéséhez a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszert (Livak, Schmittgen 2001) alkalmaztuk. A C_t küszöbértéket (threshold cycle) manuálisan határoztuk meg. Minden cDNS reakció ΔC_t értékeit a $(C_{t_{gshI}} - C_{t_{\alpha-tubulin}}; C_{gshI} - C_{\alpha-tubulin})$ képlet alapján normalizáltuk, majd a ΔC_t értékek átlagait (átl. ΔC_t) határoztuk meg. $\Delta\Delta C_t$ értékek meghatározása során a kezelt minták (átl. $\Delta C_{t_{gshI-kezelt}}$) értékeit a kezeletlen kontrollhoz (átl. $\Delta C_{t_{gshI-kezeletlen}}$) hasonlítottuk a következő képlet alapján: (átl. $\Delta C_{t_{gshI-kezelt}}$ - átl. $\Delta C_{t_{gshI-kezeletlen}}$). Az adatok abszolút értékűvé történő alakítása $2^{-\Delta\Delta C_t}$ képlettel történt (Livak, Schmittgen 2001, Gyulai 2007; Bittsánszky, Gyulai et al. 2007,2008).

ITS elemzés: Az univerzális ITS-primerekkel a teljes ITS szakaszt (ITS1-5.8S-ITS2) szaporítottuk fel (Garcia-Mas et al. 2004). A primerpár szekvenciája: tcg taa caa ggt ttc cgt agg tg / tcc tcc gct tat tga tat gc, melyet a köles és a sárgadinnye vizsgálatokhoz alkalmaztunk. **AFLP elemzés:** A szelektív amplifikációhoz 24 szelektív primer-kombinációt használtunk.

SSR elemzés: A mikroszatellita elemzéshez a kölesben négy (és egy mtDNS specifikus), sárgadinnyében nyolc SSR primerpárt alkalmaztunk. A görögdinnye (*Citrullus lanatus*) mikroszatellita elemzéséhez két primer csoportot, valamint kloroplasztisz DNS (cpDNS) specifikus primereket alkalmaztunk. Az ALF SSR primer párok egyik tagját Cy5 fluoreszcens molekulával jelöltük (Röder et al. 1998; Gyulai et al. 2005).

Az ISSR vizsgálatainkhoz a Cekic (Cekic et al. 2001) által leírt eljárást alkalmaztuk kilenc primer és azok kombinációjának alkalmazásával.

RFLP-PCR (CAPs) (cleaved amplified polymorphic DNA) hat restrikciós endonukleázt (TaqI, BsuRI, HinfI, MboI, AluI és RsaI) (Fermentas) alkalmaztunk.

WGA, Teljes Genom Felszaporítás: A WGA felszaporítás lépéseit a Sigma (WGA-2) eljárás alapján végeztük. A felszaporítás hatékonyságát minden esetben agaróz gélen és NanoDrop UV spektrofotométerrel ellenőriztük.

Klónozás: A PCR reakciókban felszaporított ITS, SSR és ISSR PCR fragmentumokat fragmentumokat a gélből izoláltuk, tisztítottuk, és klónozó vektorba építettük (pGEM-T Easy vektor kit).

Szekvenciaelemzés: A klónozott fragmentumokat automata fluoreszcens DNA szekvenátorral (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer) elemeztük, mindkét irányban elvégezve a szekvenálást. A szekvenciákat ChromasPro (version 1.11) programmal illesztettük. A szekvenciák összehasonlítását Bioedit programmal készítettük. A BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analízishez az NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA) programot alkalmaztuk. A retrotranszpozon elemzésben FastPCR és Multilin programokat alkalmaztunk. **Statisztikai értékelés:** A statisztikai elemzéseket a Microsoft Excell, valamint az SPSS14 és MEGA4 programcsomaggal végeztük.

Retrotranszpozonok izolálása görögdinnyében: A retrotranszpozon izolálásához PBS specifikus primereket alkalmaztunk (Shulman, Kalendar 2005), a fragmentumokat pGEM-T Easy (Promega) vektorba klónoztuk, *E.coli* sejtekbe transzformáltuk, szekvenáltuk, majd a szekvenciákra tervezett LTR-specifikus primerekkel PCR reakcióban amplifikáltuk.

3. Eredmények és megvitatás

3.1. In vitro klónozás és szelekció a biotechnológiai növénynemesítésben

Az in vitro növénynemesítés alkalmazásával jelentős mértékben szélesedett a biotechnológia eszköztára (in Dudits et al. 1991; in Dudits, Heszky 2000, 2003). Az ivaros- (pollen, portok, ovárium és ovulum) tenyészetek, valamint a vegetatív biotechnológiai klónok (mikroklónok, szomaklónok, protoklónok, cibridek) széles alkalmazási területet nyújtottak a biotechnológia számára az elmúlt évtizedekben (Galiba et al. 1986; Sági et al. 1989; Pauk et al. 1991; Kiss J et al. 1992; Gyurján et al. 1995; Gyulai et al. 2004; Kiss, Gyulai et al. 2004; in Heszky et al. 2005). Kutatásaim során az in vitro klónozásban a szomatikus embriogenezist bizonyítottam SEM elemzéssel.

3.1.1. Sziki mézpázsit (*Puccinellia limosa*) klónozása szomatikus embriogenezissel

Az egyszikű fajok vegetatív sarjadással (bokrosodás) természetes úton is jól klónoznak, azonban a szomatikus embriogenezisük kidolgozása csak az 1980-as évekre vált rutinszerűvé. Kutatásaim során számos fajra dolgoztam ki ezt a módszert: sziki mézpázsitban (*Puccinellia limosa*) (Jekkel, Gyulai, Heszky 1995); tarackbúzában (*Agropyron repens*) (Gyulai et al. 1995abc; Tárczy, Gyulai et al. 1996; Hangyelne, Gyulai et al. 1996; Mázik-Tőkei, Lelley, Gyulai et al. 1997), és zöld pántlikafűben (*Phalaris arundinacea*) (Gyulai et al. 2000ab, 2003b).

Az előállított klónok között új morfológiai mutánst (*Agropyron repens* cv. 'Purdue') írtam le (Tárczy, Gyulai et al. 1996), illetve lignin-tartalomban csökkentett pántlikafű (*Phalaris arundinacea*) szomaklónként szelektáltam (Gyulai et al. 2003ab).

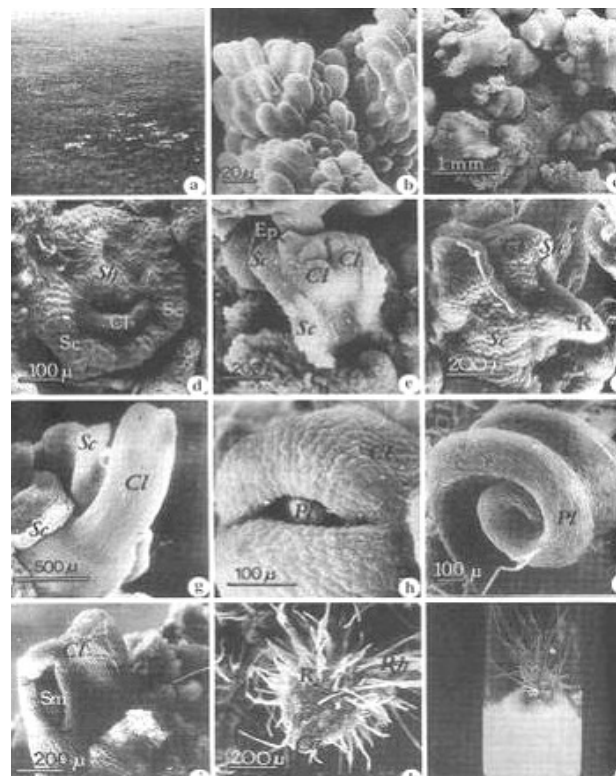
A teljes morfogenetikai elemzést a mézpázsitban végeztem el (2. ábra), melyben érzékeny felbontással alapvető SEM (Scanning Electrom Mycroscopy) elemzést végeztem el egyszikű fajban (Jekkel, Gyulai, Heszky 1995).

A kutatások végső eredménye az volt, hogy a rizs sőtűrésre történő nemesítéséhez szolgáltatott kísérletes adatokat a hazai flóra legsőtűrőbb egyszikű fájának in vitro tanulmányozásán keresztül (Binh et al. 1989, 1992; Heszky et al. 1989ab). A *Puccinellia* fajok, ugyanis szénhidrát akkumulációs („méz – pázsit”) mechanizmussal védik ki az extrém környezeti sókoncentrációt. Az Alföldön mind a szolonszák- (Duna-Tisza köze, Fertő-tó), mind a szolonszák-szolonc (Tiszántúli) talajon megélnek (Stefanovits 1981; Várallyay 2005).

3.1.2. Vadgesztenye (*Aesculus hippocastanum*) klónozása járulékos embriogenezissel

A vadgesztenye (*Aesculus hippocastanum* L.) járulékos embriogenezisen keresztül történő klónozásának a célja a mesterséges magtechnológia és kriobiológiai tárolhatóságának kidolgozása, valamint alginátos beágyazása (in Dudits, Heszky 2003), továbbá a vadgesztenye aknázómoly (*Cameraria ohridella* Deschka et Dimic) (*Lepidoptera*, *Gracillariidae*) elleni rezisztencia nemesítés alapjainak kidolgozása volt. Ebben a munkában a az egysejt-eredetű szomatikus embriók fejlődésének bizonyítását végeztem el.

A kísérletekhez 14 napos (2 mm) ivaros embriókat izoláltunk, majd 2 mg/l benziladenin tartalmú WPM táptalajon 28 napig inkubáltuk (Jekkel, Gyulai et al. 1998), a fejlődő járulékos embriókat szkennig elektron mikroszkóp vizsgálatokban elemeztük (Gyulai et al. 1993a). A járulékos embriók fejlődésük során végig mentek a gömb, torpedó, szív stádiumokon, a teljes növény kifejlődéséig. Eredményeink azért különös jelentőségűek, mert ellentétben a számos



2. ábra. A sziki mézpázsit (*Puccinellia limosa*) szomatikus embriogenezisének SEM elemzése. Az Alföld szikfokainak legsőtűrőbb egyszikű faja (a); embriogén kallusz indukció (b,c), és embriogenezis: szkutellum (Sc) (embriópajzs) (d), a hajtás csúcs (sh) és a rügyhüvely (coleoptil, lc) és gyökércsúcs (R) megjelenésével (e), illetve a az elsődleges levél (Pl) kifejlődésével (g-f), a teljes gyökérzet kialakulásáig (gyökérsüveg Ca; gyökérszőr – Rh) (k), és a teljes növény kifejlődése (l). Ritka jelenség az egyszikűek ikerembrió (j) kialakulása (Jekkel, Gyulai, Heszky 1995).

vadgesztenye szomatikus és pollen embriogenezis indukcióval, a zigótikus embriók klónozása járulékos embriogenezisen keresztül kevésbé kidolgozott módszere a vadgesztenye in vitro nemesítésének.

3.1.3. A szója (*Glycine soya*) klónozása szomatikus embriogenezissel

A szója szomatikus embriogenezisének kidolgozására a hazai tripszin inhibitor mentes fajták in vitro nemesítéséhez szolgáltatva az alapanyagot. A szója mintegy 5000 éves kínai növény, kezdetben csak vetésforgóban használták, és csak a Chou-dinasztia idején (i. e. 1134–246) jöttek rá arra, hogy az addig ehetetlen szóját fermentálással ehetővé lehet tenni. Az időszámításunk előtti 2. században ismerték fel ugyancsak a kínaiak, hogy kalcium- vagy magnézium-szulfáttal kicsapatható a főzött szójapüré (tofu). A fermentálással és kicsapással azonban nem távolítható el az összes károsító anyag a szójából, mert *tripszin-inhibitorok* maradnak benne, melyek gátolják a fehérjeemésztést. Ezért a új tripszin-inhibitor-mentes szója nemesítés kiemelt fontosságú.

Kutatásaink során, az in vitro regeneráció morfológiai elemzését végeztem el, igazolva a szomatikus embriogenezisen keresztüli klónozást. Az előállított nemesítési alapanyagok elemzése, illetve nemesítése a klasszikus módszerekkel folyik tovább (Hódos-Kotvics, Heszky 1989).

További fajok elemzésére, helyszűke miatt, csak utalok: tarackbúzában (*Agropyron repens*) (Gyulai et al. 1995abc; Tárczy, Gyulai et al. 1996; Hangyelné, Gyulai et al. 1996; Mázik-Tőkei, Lelley, Gyulai et al. 1997), és zöld pántlikafűben (*Phalaris arundinacea*) (Gyulai et al. 2000a, 2003b); valamint az ivarsejt eredetű, dihaploid paprika (*Capsicum annuum*) regeneránsok (Gyulai et al. 1999ab, 2000b; Gémesné et al. 2000, 2001) morfológiai klónelemzését végeztem el.

3.2. Fitoremediáció

3.2.1. A 35S-*gsh1*-transzgenikus szürkenyár (11ggs, 6lgl) klónstabilitásának meghatározása

A több mint tíz éve vegetatív úton fenntartott, *gsh1*-transzgenikus szürkenyár klónokban (Gullner és Kőmives 1998; Kőmives et al. 1998) szükséges volt igazolni a *gsh1* transzgen stabil jelenlétét (Gyulai et al. 2005), nehézfém felvételi kapacitását (Gyulai et al. 2005) és aktivitását (expresszióját) (Bittsánszky, Gyulai et al. 2006). Emellett el kellett végezni egy klónstabilitási vizsgálatot (1. táblázat), melyhez AFLP-módszert alkalmaztunk. A 24 szelektív AFLP primerkombinációból 12 kombináció adott éles és reprodukálható AFLP mintázatot. Összesen 682 AFLP fragmentet detektáltunk (1. táblázat). A szelektív primer párok átlagosan 56,6 fragmentet szaporítottak fel, amely hasonló

1. táblázat. Az fAFLP fragmentumok száma a *gsh1* transzgenikus szürkenyár (*P. × canescens*) 11ggs és 6lgl klónjaiban, valamint a nem transzformált kontroll (WT) klónban. A szelektív primerkombinációk: az *Mse*-CAC primer kombinálva az *Eco*-AAT (a), *Eco*-ACC (b), és *Eco*-AGT (c) primerekkel; valamint az *Eco*-AGT primer kombinálva az *Mse*-CAA (d), *Mse*-CAG (e), *Mse*-CAT (f), *Mse*-CCC (g), *Mse*-CCT (h), *Mse*-CGA (i), *Mse*-CGC (j), *Mse*-CTA (k) és *Mse*-CTC (l) primerekkel (Gyulai et al. 2005)

klónok	az fAFLP fragmentumok száma szelektív primerpáronként (a-l)												összes frag. #
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	
11ggs	25	6	17	30	25	35	16	14	11	9	17	21	226
6lgl	25	6	17	30	25	35	19	14	11	9	17	21	229
WT	25	6	17	30	25	35	17	14	11	9	17	21	227

nagyságrendű a feketenyárban (*P. nigra*) megfigyelt fragmentum számhoz, ahol két primer pár összesen 104 fragmentumot szaporított fel (Smulders et al. 2001).

A leghatékonyabb primer kombinációnak az *Eco*-AGT / *Mse*-CAT bizonyult, amely klónonként 35 fragmentumot szaporított fel. A 682 fragmentum közül 4 volt polimorf (0,6 %), amelyek közül egy a nem transzformált kontroll nyárban, három a 6lgl transzgenikus klónban amplifikálódott az *Eco*-AGT / *Mse*-CCC primerpárral.

Az eredmények szerint a 11ggs klón AFLP-vel detektált genetikai változása 0,4% volt a kontrollhoz képest, a 6lgl klóné 0,8 %. Irodalmi adatok szerint a *Populus* fajokkal végzett vizsgálatokban két – azonos fajba tartozó – klón között az AFLP fragmentumokban magasabb, 15 %-os eltérést mutatott. Az eredményeink bizonyítják, hogy a kísérleteinkben alkalmazott *P. × canescens* klónok genetikailag stabilak, a rügymutáció mértéke a transzgenikus nyárfában alacsony (0,8 %) eltérően más nyárfajtától, illetve a gyümölcsfáktól.

3.2.2. Transz/gén reaktiváció DHAC-indukált demetilációval

A nyárfá genetikai kutatása azért jelentős, mert kis genomú (5.5×10^8 bp), a genom mérete alig négyszerese az *Arabidopsis* genomnak ('a fák arabidopszisa') és minden faja diploid ($2n = 38$) (Taylor 2002). A vizsgálatainkban alkalmazott *gshI* szűrkenyár klónokat (INRA 717-1-B4) fitoextrakciós kapacitás növelésére állították elő (Leple et al. 2000), és igazolták fitoextrakciós kapacitásukat (Arisi et al. 1997; Noctor et al. 1998; Gyulai et al. 2005). A legstabilabb transz/gén konstrukciók is ki vannak téve azonban a gén-csendesítés (*gene silencing*) hatásának, amely elsősorban a DNS metilációján keresztül megy végbe a DNS metiltranszferáz enzim (CMT) katalízisével. A CMT-inhibitor kezelésnek kitett növényekben a metilációs szint csökkenése igazolt, vizsgálatainkban ezért a transz/gén reaktivációban hatékonynak bizonyult, DNS metiltranszferáz (CMT) enzim gátlásán keresztül ható DHAC (5,6-dihidro-5'-azacitidin hidroklorid) (Cao et al. 2000) indukciót alkalmaztuk a 11ggs és 6lgl *gshI*-transzgéikus nyárfaklónokban, valamint a nem-transzformáns klónban (Gyulai 2007; Bittsánszky, Gyulai 2007; Gyulai et al. 2008).

A transzgén-*gshI* relatív expressziós szintje a 6lgl klónokban 13,5-szor nagyobb volt, mint a 11ggs klónban (1,0) a DHAC kezelés nélkül. Ez a különbség a demetiláció hatására megkétszereződött a 6lgl klónban (23,7), míg a 11ggs klónban csökkent (0,4). A transzgén kópiaszámának meghatározásakor kiderült, hogy a 6lgl klón magas expresszós szintje egy 60%-kal alacsonyabb kópiaszámú transzgén-beépülés (1,0 - 6lgl) ellenére érvényesült (1,6 - 11ggs) (2. táblázat).

2. táblázat. A 35S-*gshI* (*E. coli*) transzgén relatív kópiaszáma a transzgénikus szűrkenyár (*P. x canescens*) klónokban (11ggs - a, és 6lgl - b), az aktin gén kontrolljában. Az RT-qPCR elemzéshez a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ módszert (Livak, Schmittgen 2001) alkalmaztuk, klónonként három ismételtsben (Bittsánszky, Gyulai et al. 2007a).

(a)	<i>gshI</i>		<i>actin</i>		ΔCt		$\Delta\Delta Ct$		<i>gshI</i> kópiaszám		
	Ct	SD	Ct	SD	érték	SD	érték	SD	érték	-/+ tartomány	
11ggs/1	22,71		23,02		-0,31						
11ggs/1	22,82		23,11		-0,29						
11ggs/1	22,59		22,89		-0,3						
11ggs/2	22,33		22,88		-0,55						
11ggs/2	22,44		22,88		-0,44						
11ggs/2	22,11		22,70		-0,59						
átlag	22,50	0,26	22,91	0,14	-0,41	0,13	-0,75	0,13	1,69	1,54	1,85

(b)	<i>gshI</i>		<i>actin</i>		ΔCt		$\Delta\Delta Ct$		<i>gshI</i> kópiaszám		
	Ct	SD	Ct	SD	érték	SD	érték	SD	érték	-/+ tartomány	
6lgl/1	23,9		23,76		0,14						
6lgl/1	23,68		23,28		0,4						
6lgl/1	23,66		23,07		0,59						
6lgl/2	23,86		23,55		0,31						
6lgl/2	23,86		23,32		0,54						
6lgl/2	23,56		23,49		0,07						
átlag	23,75	0,14	23,41	0,24	0,34	0,21	0	0,21	1	0,86	1,16

A nyár saját *gshI* génjének relatív expressziós szintje is igen nagymértékű emelkedést mutatott a demetilációs kezelések hatására (19,7-szeres expresszió növekedés) (3. táblázat). A 11ggs klónban a nyár-*gshI* gén preferencia hatását tapasztaltuk a 2,0-szeres rel. expresszió növekedéssel, szemben a *gshI*-transzgén reaktiváció 0,4-szeres értékével. A 6lgl klónban a *gshI*-transzgén mutatott magasabb demetilációs induktivitást (23,7), mint a saját nyár-*gshI* génje (13,9).

A 6lgl klónok *gshI* és *gshI* génexpressziójának összehasonlítása alapján igazolható, hogy a *gshI*-nyárfá gén szignifikáns mértékben volt reaktívalhatóbb (2,6-ról 13,9-re, amely 8,6-szoros növekedés), mint a transzgén, amely magas expressziós szintje csak 1,8-szorosára (23,7) nőtt.

A *gshI*-transzgén és a *gshI*-nyárfágén kompetícióját jelzi,

3. táblázat. A 35S-*gshI* transzgén és a *gshI* nyárfágén relatív expressziója a DHAC (10^{-4} mol, 7 nap) kezelt, és kezeletlen transzgénikus szűrkenyár (*P. x canescens*) klónokban (11ggs, 6Lgl), valamint a nem transzformáns (WT) klónban (Gyulai 2007; Bittsánszky, Gyulai et al. 2007a)

klónok	<i>gshI</i> -transzgén ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)			<i>gshI</i> -nyárfágén ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)		
	nem-kezelt	DHAC-kezelt	növekedés X	nem-kezelt	DHAC-kezelt	Növekedés x
11ggs	1.0	0.4	0.4	3.1	2.0	2.5
6Lgl	13.5	23.7	1.8	1.6	13.9	8.7
WT	-	-	-	1.0	19.7	19.7

hogy a *gsh1*-nyárfagénnek a nem-transzformált (X) klónban mért DHAC-indukált génexpresszió-növekedését (1,0-ról 19,7-re, 19,7-szeres relatív expresszió növekedés), sem a 11ggs (0,8-ról 2,0-re, 2,5-szörös expresszió növekedés), sem a 6lgl klón (1,6-ról 13,9-re, 8,7-szeres expresszió növekedés) nem múlta felül. Mindezek mellett, a DHAC-nem-kezelt *gsh1*-transzformált 6lgl klón magas transzgén-*gsh1* expressziós szintje (13,5-ször magasabb a 11ggs klónban mért értéknél) igazolja a 6lgl klón hatékonyabb fitoremediációs kapacitását, amelyet *in vitro* nehézfémmel felvételi eredmények is alátámasztanak (Gyulai et al. 2005). A 6lgl klónban mért nagyobb mértékű *gsh1* aktivitás (szemben a 11ggs klónnal) a transzgén konstrukció eredménye, amely tartalmazott egy borsó *rbcS* (RuBPCase SSU: small subunit of RuBPCase, *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase*) eredetű tranzit peptid szekvenciát is, amely elősegítette a kloroplasztiszokban történő GSH akkumulációt (Arisi et al. 1997; Noctor et al. 1998). Az eredmény egyben igazolja a tranzit-peptidok kiemelkedő szerepét a génkonstrukciókban, hasonlóan a dohányban vizsgált tranzit peptid konstrukciókhoz, illetve erősítik a kloroplasztisz transzformációk rendkívüli jelentőségét (Maliga 1995). Nem zárható ki a két transzgén szelektív metilációja sem, ahogy ez transzgén piramidálás (egymást követő gén transzformáció azonos növénybe) során tapasztaltó. A DNS metiláció forró pontjai a génpromóterek CpG és a CpNpG szekvenciái, ezzel transzkripcionális géncsendesítést (down-reguláció, hipermetiláció) eredményeznek (*transcriptional gene silencing* TGS). Ez a folyamat is indukálható DNS metilező szerekkel (pl. 3-aminobenzamid). A vizsgálatainkban alkalmazott DHAC ennek a folyamatnak az ellenkező hatását indukálja (gén up-reguláció, DNS hipometilezés, demetiláció), hasonlóan a többi (humán rákterápiában is alkalmazott MTáz inhibitorokhoz: zebularin; 5-azacitidin (5-azaC); 5-aza-2'-deoxycytidine, melyek közül csak a DHAC hidrolitikus stabilitása igazolt (Cao et al. 2000). A DHAC-indukált *gsh1* gén reaktiváció végső célja egy alternatív lehetőség kidolgozása volt a transzgénikus *gsh1* nyárfaklónok kiváltására, illetve a GMO – kontra nem-GMO kérdés feloldására (Balázs et al. 1985; Hornok 2000; in Dudits, Heszky 2003) - a szabadföldi alkalmazás folyamatban van.

Eredményeink igazolják továbbá, hogy a DHAC-indukált demetiláción keresztüli transz/gén-reaktivációval növelhető a stressz-indukálható gének expressziója, ezen keresztül stressz-ellenállósága (Király, Klement 1968; Lehoczi et al. 1992; Barna et al. 1993; Purnhauser et al. 2000ab; Szigeti et al. 2001; Tar et al. 2002; Kocsy et al. 2004). Annak köszönhetően, hogy a DNS metilációs mintázata öröklődik („*epigenetikai memória*”), a DHAC-kezelt nyárfa új forrása lehet a fitoextrakciós alkalmazásokhoz.

3.2.3. Új mikroszatellita klóntípusok azonosítása feketenyárban (*P. nigra*)

A nyárfajok (*Populus* ssp) extrém kisméretű genomja ($2n = 4x = 38$; 5.5×10^8 bp; $2C = 1.1$ pg) nagyfokú genetikai stabilitással párosul. A kutatások célja a feketenyár (*Populus nigra*) genetikai variabilitásának növelése volt haploid (n) indukcióval, portoktenyészetben (Kiss J et al. 2001), két portok-donor klón (N-SL és N-309) alkalmazásával, új mikroszatellita genotípusú feketenyár klónok előállítására és molekuláris azonosítására (Törjék et al. 2001).

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100																				
AJ297293	CTTGT	TTATT	TTTAA	TACTCT	CATT	TGCTG	TGTAAT	GCTAG	AAGTG	CTG	TGCTC	TGGT	A	TAC	TTG	TGCTT	TAG	CA	ATTT	GG	AC	AG	A	T	A	G	G	C	A	
P.n.wms-20	CTTGT	TTATT	TTTAA	TACTCT	CATT	TGCTG	TGTAAT	GCTAG	AAGTG	CTG	TGCTC	TGGT	A	TAC	TTG	TGCTT	TAG	CA	ATTT	GG	AC	AG	A	T	A	G	G	C	A	
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200																				
AJ297293	TAA	CC	TT	CATT	TAA	AGC	ATT	AA	TG	TC	CT	CATA	ATTT	GCC	GT	TTT	AT	TGG	AT	CT	TA	TG	CT	TA	TG	CT	TA	TG	CT	
P.n.wms-20	TAA	CC	TT	CATT	TAA	AGC	ATT	AA	TG	TC	CT	CATA	ATTT	GCC	GT	TTT	AT	TGG	AT	CT	TA	TG	CT	TA	TG	CT	TA	TG	CT	
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300																				
AJ297293	C	G	T	G	C	T	T	C	A	A	C	A	C	A	T	C	G	T	C	T	G	C	T	G	C	A	A	G	A	A
P.n.wms-20	C	G	T	G	C	T	T	C	A	A	C	A	C	A	T	C	G	T	C	T	G	C	T	G	C	A	A	G	A	A
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400																				
AJ297293	G	T	T	A	C	T	A	G	A	T	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
P.n.wms-20	G	T	T	A	C	T	A	G	A	T	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	

3. ábra. Szekvencia elemzés a feketenyár (*Populus nigra*) WPMS-20 mikroszatellita lokuszán (ctggtt)_n a génbanki adat (AJ297293) és NS-L-30 klón összehasonlításával (az SNP, az ismétlődő és deléciós nukleotidokat kiemelés jelzi) (Bittsánszky, Gyulai et al. 2007b)

A kontinentális éghajlaton (ld. Magyarország) a feketenyár fontossága messze felülmúlja a többi nyárfát (növekedési erély, fahozam, stb.). A kutatásaink célja, ezért, új mikroszatellita genotípusú (Kiss J et al. 2001) feketenyárklónok molekuláris azonosítása volt, későbbi fitoremediációs alkalmazásra. A klónális variabilitás SNP (*single nucleotide polymorphism*) elemzésére a kontroll NSL-30 klónból a WPMS-20 lokuszon kapott fragmentumot agaróz gélből visszazsoláltuk és két irányból megszektveztük. A szekvencia az ismétlődő szekvenciarezsztlet számának kivételével a génbanki AJ297293 számú szekvenciával mutatott egyezést (3. ábra). Az ismétlődő szekvenciamotívum (ctggtt)_n azonban a szekvenált mintában a 3-szor ismétlődött, míg az adatbázisban szereplő mintában 8-szor (3. ábra). A kimutatott (ctggtt)₅ deléció, a haploid indukció során végbement gametoklónális variabilitás (in Dudits, Heszky 2003, 2005) molekuláris fixálásának az eredménye (Bittsánszky, Gyulai et al. 2007). A felnevelt haploid feketenyár klónok (1-35) genetikai polimorfizmus elemzését további öt (előzetesen tesztelt primersorozatból kiválasztott) SSR lokusz allél diverzitásával jellemeztük. A leginkább polimorf lokusz a WPMS-20 bizonyult, mert itt hat nukleotid ismétlődése

adta a mikroszatellita régiót annak ellenére, hogy a dinukleotid ismétlődésű régiók (mint a többi öt lókuszt) elméletileg sokkal változékonnyabbak. A természetes feketenyár populációk nagyobb variabilitást mutattak eredményeinknél, valószínűleg az aktívabb rügymutáció következtében, hasonlóan a nagymértékű genetikai polimorfizmus detektálásához *P. cathayana* klónok között (Schoot et al. 2000).

3.3. Kultúrnövények archeogenetikai stabilitása

3.3.1. A köles (*Panicum miliaceum*) genomstabilitása a középkor óta

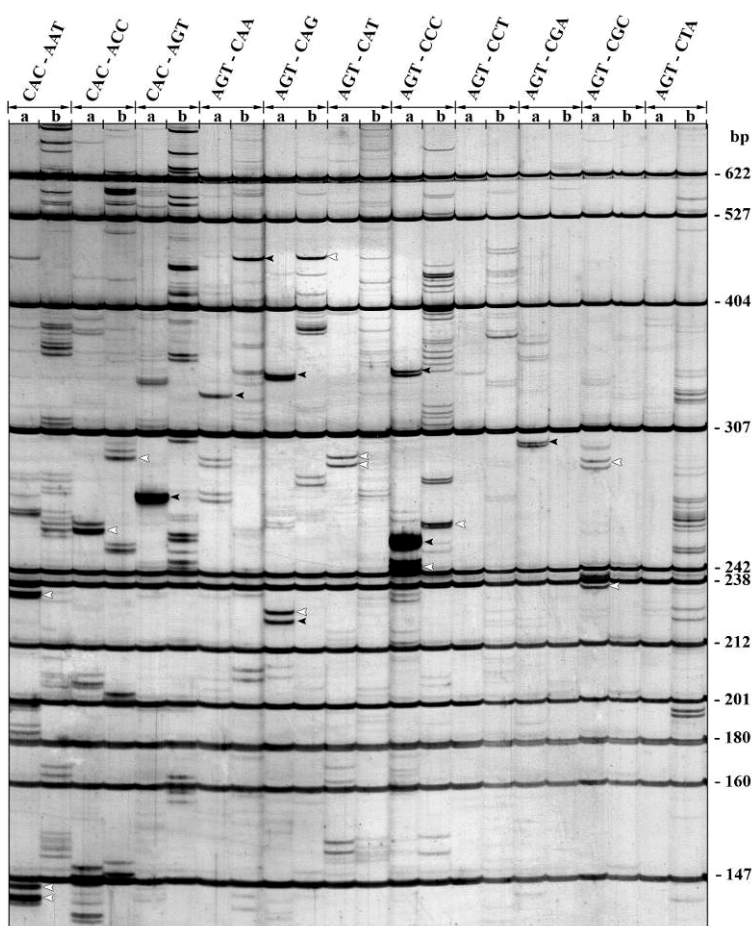
A köles (*Panicum miliaceum*, $2n = 4x = 36$) az árpa mellett a legősibb kultúrnövényünk. A földművelő sztyeppei népek (kelták, hunok, avarok, magyarok) illetve a Termékeny Félhold népeinek legfontosabb gabonája a köles volt (i.e. 2000) az évenkénti kétszeri aratás lehetősége miatt (60 napos tenyészidejű fajták is ismertek)

Géncentruma (ösházája) Kína (Vavilov 1951; Vaughan et al. 2007), a kínai birodalomban maga a mindenkor uralkodó vetette el, hagyományos szertartás keretei között. A leghíresebb leletek is Kínából kerültek elő az i.e. 5000 – 3200 származó korokból. A legrégebbi (DK-Ázsiai) *Hoabinh* kultúrából (i.e. 10.000-6000) nem került elő.

AFLP fragmentumok a középkori köles (*Panicum miliaceum*) mag maradványok DNS mintáiban: A 15. századi budavári ásatások során 195 növény, több mint 3 millió maglelete került elő (Gyulai et al. 2006), nemzetközileg is jelentős leletanyagot biztosítva a régészeti genetikai kutatásokhoz. A nagyszámú archeobotanikai feldolgozás ellenére a köles régészeti genetikai kutatása nemzetközileg is csak napjainkban kezdődött a 4. századi (mongóliai leletek) (Gyulai et al. 2006), és a 15. századi (Budavári leletek) magleletek (Lágler, Gyulai et al. 2005, 2007) DNS elemzésével. Vizsgálataink során AFLP, SSR, ISSR és CAPs elemzést végeztünk.

Az AFLP vizsgálatokban a módszer fluoreszcens változatát alkalmaztuk (fAFLP - fluorescent amplified DNA fragment length polymorphism) 24 szelektív primer kombinációjával, melyből 12 pár adott éles és reprodukálható AFLP mintázatot (4. ábra). Az adatok alkalmasak voltak a DNS degradáció mértékének becslésére: a 4. sz. mintában csak két fragmentum található (98.8% degradáció), a 15. századi mintában 158 AFLP fragmentum (40%-os degradáció), szemben a mai mintában talált 264 (100%) AFLP fragmentummal. Az AFLP fragmentumokat szekvenáló PAGE gélen elemezve, 21 fragmentumot tudtunk visszaizolálni, klónozni majd szekvenálni. A klónok közül 8 fragmentum szekvenciája volt elemezhető. A 15. sz.-i *Eco*AGT-*Mse*CAC-272 fragmentum BLAST analízisében az *Ugpe* ABC-transzporterrel (permeáz); míg az *Eco*AGT-*Mse*CAA-462 fragmentum ('topáz') a *gypsy*/*Ty3* retrotranszpozonnal mutatót szekvencia hasonlóságot (Gyulai et al. 2006).

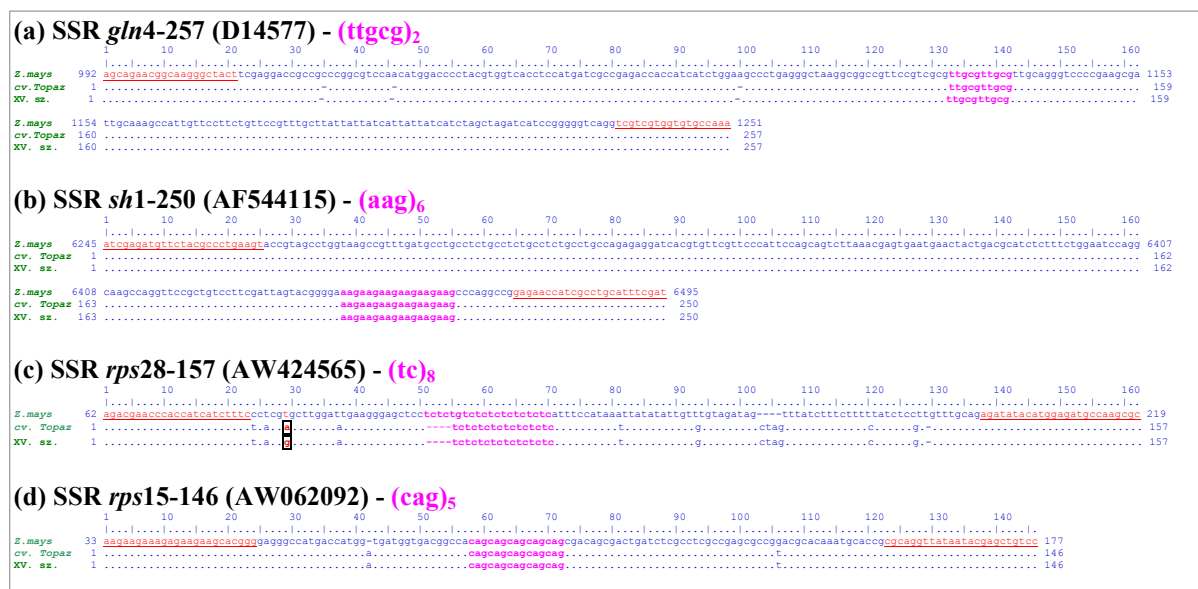
A köles SSR-allélstabilitása: A mikroszatellita (ALF-SSR) vizsgálatokat 35 lókuszon végeztük, ebből 4 bizonyult összevethetőnek a középkori és a mai köles mintában a *gln4* (257 bp), *sh1* (250 bp), *rps28* (157 bp), és az *rps15* (146 bp) lokuszon (5. ábra). Mindössze egy nukleotid-változást (SNP) mutattunk ki (A→G szubsztitúció) az *rps28* SSR locus 29. nt-ben, az összes 810 nt SSR szekvenciában. Eltérően a kétszikű sárgadinnyében tapasztalt igen nagymértékű SSR-variabilitástól (Szabó, Gyulai et al. 2007) a vizsgált köles SSR lokuszok egyikében sem mutattunk ki változást az ismétlődések számában. Az eredmények a köles egyszikű genomjának rendkívüli stabilitását igazolják, összevetve az



4. ábra. AFLP-elemzés poliakril amid (PAGE) gélelektroforézissel, fragmentum izoláláshoz a 15. századi (a) és a mai 'topáz' köles (*Panicum miliaceum*) fajtában (b), 1-11 szelektív primer-pár kombinációjával (a fekete nyilak jelzik a visszaizolált fragmentumokat (Gyulai et al. 2006)

azonos korból feltárt sárgadinnye kétszikű genomjában végbement nagyfokú mikroevolúciós változásokkal (Szabó, Gyulai et al. 2005ab). Ezt az eredményt támasztják alá a CAPs (RFLP-PCR) eredményeink is, amelyben hat restriktációs hasítóhely szekvenciájában (*TaqI*, *BsuRI*, *HinfI*, *MboI*, *AluI* és *RsaI*) nem történt mutáció az mtDNA-6 lokuszon (Z11512).

A mikroszatelliták által hordozott információ különös jelentősége az, hogy gének promóter régióiba épülve alkalmasak a gén, illetve a hordozó faj(ita) genetikai azonosítására. A vizsgált négy köles SSR lokusz is génkapcsolt volt (*gln4* – glutamin szintáz, *sh1* – szacharóz szintáz (shrunken1); *rps28* és *rps15* - kukorica cDNS klóntárból).



5. ábra. SNP elemzés a középkori köles (15.sz.) és a mai cv. 'topáz' kölesfajta (*Panicum miliaceum*) négy SSR lókuszán (a – d) (összesen 810 nt), és a kimutatott G → A tranzíció az *rps28* lókuszon (Gyulai et al. 2006)

A köles ISSR-polimorfizmusa: A mikroszatellita genom elemzés speciális területe az ISSR-elemzés, amely módszerrel két SSR szakasz közötti szekvencia szaporítható fel (Zietkiewicz et al. 1994). Az ISSR-PCR számos esetben nagyon hatékony molekuláris módszernek bizonyult intraspecifikus, populációk közötti vizsgálatokra, fajtaspecifikus mintázatok meghatározására.

A középkori köles morfológiai rekonstrukciója: ISSR elemzéseinkben 9 primert és kombinációit alkalmaztuk. Ezek közül négy ISSR primer bizonyult polimorfnak: FV808 (6 ISSR fragmenrum); FV821 (5 ISSR fragmentum); FV835 (4 ISSR fragmentum); FV841 (7 ISSR fragmentum). A polimorf ISSR fragmentumok cluster elemzése alapján a középkori köles az 'Omszkoje-9' ázsiai eredetű köles fajtához mutatta a legközelebbi rokonságot, amely eredmény nyívánvalóan utal a régészeti minta keleti eredetére.

A fenotípusos felvételezés során a vizsgált 28 morfológiai bélyeg alapján megrajzolható (SPSS11) volt a mai fajták morfológiai dendrogramja. Ezt összehasonlítva a molekuláris dendrogrammal rekonstruálható volt a középkori köles minta, amely terpett bugájú, apró kaláshkájú, barna magvú köles lehetett, ma is fellelhető közeli rokon fajtákkal (ld. az Omszkoje-9 fajta oroszországi gyűjtőhelyét). A 4.sz. minta két AFLP fragmentuma kevésnek bizonyult az 1.600 éves fajta rekonstrukciójához. A 600 éves középkori lelet 'csírázási' kísérlete is sikertelen maradt, megkérdőjelezve az ősi magleletek csírázásáról szóló eredményeket a 10.000 éves csillagfűrt, az 1.300 éves indiai lóbusz, illetve az 1-2.000 éves egyiptomi kamut búzalelet esetében.

3.3.2. A sárgadinnye (*Cucumis melo*) mikroszatellita diverzitása a középkor óta

A sárgadinnye ($2n = 4x = 24$) a fajgazdag *Cucurbitaceae* család (119 nemzetség, 825 faj) *Cucumis* nemzetségének morfológiailag legdiverzebb faja (Velich 1967; Molnár 1973, Nagy 2003a,b). A *Cucumis* nemzetségben, a két termesztett faj (sárgadinnye - *C. melo*; és az uborka - *C. sativus*) mellett több, kérdéses *Cucurbitaceae* faj került besorolásra. Elsődleges géncentruma (Vavilov 1951) Afrikába tehető. Az első termesztett típus a *chate* lehetett (i.e. 2000 – 1500). A Bibliában (Moz. IV, 11:5) említett sárgadinnye is feltételezhetően *chate* típusú volt.

Számos hazai lelet közül (Hartványi, Nováki 1975) a legrégebbiek római koriak (Budapest-Aquincum) az időszámítás szerinti. 2. - 3. századból. A Budai vár területén folytatott ásatások során feltárt 13-14. századi kutak betöltéseiben, több sárgadinnye mag lelet is felszínre került. A jelen munkában vizsgált magleletek a Budai királyi vár Zsigmond-kori szárnyának (15. sz. eleje) régészeti feltárásaiból kerültek elő (Gyulai et al. 2001; Bacsó et al. 2004; Bisztray et al. 2004a,b; Gyulai et al. 2006; Szabó, Gyulai et al. 2005ab). A magokból történő sikeres ősdNS-izolálás és genotípus azonosítás után a morfológiai, fenotípusos fajtarekonstrukciót 47 mai fajta összehasonlításával végeztük el.

A sárgadinnye mikroszatellita diverzitása: Az ALF-SSR elemzéseinkben 34 primer-párt teszteltünk, ebből 20 primer-pár bizonyult hatékonynak a mai fajtákban, amelyek közül csak nyolc primerpár volt aktív a középkori mintában. A nyolc lokuszon elvégzett SSR elemzéssel összesen 40 SSR allél 485 szekvenciáját azonosítottuk a 47 mai és a középkori mintában. Az egyes lokuszok alléldiverzitása eltérő volt (2 és 7 allél/lokusz, átlag értékük 5.7 allél/lokusz): CmCT44 (2 allél), CmAG59 (5 allél), CmGA104 (5 allél), CmCT134 (4 allél), CmTA134 (6 allél), CmCTT144 (7 allél), CmTC168 (6 allél) és CmCT170 (5 allél). A 8 SSR lokusból hét dinukleotid, és egy trinukleotid ismétlődésű volt (CmCTT144 - 7 allél). Két SSR lokusz (CmCT170, CmTTT144) teljes szekvenciaelemzését végeztük el a középkori és a mai sárgadinnye fajtában. Megállapítottuk, hogy az SSR allélek hosszúság polimorfizmusa mindig egy teljes SSR alapszekvencia, egyszeres vagy többszörös kieséséből (delécio) illetve beépüléséből (inszercio) adódik (indel), és sohasem a lezáró szakaszok mutációjából (Szabó, Gyulai et al. 2005ab). Egyetlen esetben sem tapasztaltunk rekombináns (tört) SSR szekvenciát, amelyben a belső ismétlődő szekvencia változott volna meg (Szabó 2006).

Igazoltuk, hogy a középkori sárgadinnye lelet SSR allél hosszúsága köztes értéket mutat (sem nem a legrövidebb, sem nem a leghosszabb), amely feltételezi, hogy a középkori sárgadinnye nem a legősibb fajtatípus lelete (Szabó, Gyulai et al. 2007). A 485 SSR fragmentum alapján molekuláris dendrogrammot (SPSS14) készítettünk, amellyel megállapítottuk a molekuláris rokonságot a mai fajták (20 ősi tájfajta, és 27 termesztett fajta) és a középkori lelet genetikai állománya között.

Középkori sárgadinnye fajtarekonstrukciója: A fajtarekonstrukcióhoz meg kellett határozni a fajták típusát és rokonsági körét egy morfológiai dendrogram elkészítésével. A vizsgálatokhoz 47 mai sárgadinnye fajtát és tájfajtát felvételeztünk 28 morfológiai tulajdonság alapján. Az elemzés szerint, a magyarországon termesztett 47 fajta kivétel nélkül besorolható volt az Európában elterjedt három fő terméstípusú csoportba: a cikkelyesen barázdás Kantalup (*cantalupensis*), a hálózatos-recés terméshéjú Retikulatusz (*reticulatus*), és a simahéjú Inodorusz (*inodorus*) csoportba. Európai fajta gyűjtemények elemzéseiben is ez a három típus elterjedése igazolódott. Az elvégzett morfológiai elemzést összevetve molekuláris dendrogrammal a középkori minta fajta-típusa meghatározható volt, amely szerint az egy inodorusz típusú, sima héjú, zöld húsú sárgadinnye lehetett, átmeneti formával a 'Hógolyó' és a 'Kőszárga' mai termesztett fajták között (Szabó, Gyulai et al. 2005ab, 2007; Horváth, Gyulai et al. 2007).

3.3.3. A görögdinnye (*Citrullus lanatus*) archeogenetikai jellemzése

A görögdinnye (*Citrullus lanatus*; $2n = 2x = 22$; $4.25 - 4.54 \times 10^8$ bp; 0.42 pg DNS) a rendkívül monotipikus *Citrullus* nemzetség tagja, melynek kevés faja közeli morfológiai rokonságban áll egymással: *Citrullus colocynthis*, *Citrullus ecirrhosus*, *Citrullus rehmi* vadfajokkal. A görögdinnye evolúciós kutatásának kiemelt jelentőségét az adja, hogy két alfaja a *Citrullus lantatus* var. *lanatus* és a *Citrullus lantatus* var. *citroides* máig fennmaradt párhuzamos evolúciójuk során. Elsődleges géncentruma az Abesszíniai övezet, illetve trópusi Afrika, másodlagos géncentruma Kína, Belső-Ázsia és India (ld. *Praecitrullus* fajokat) (Vavilov 1951). Nagyfokú morfológiai variabilitását a héj, a hús, és a mag színe és formája adja. Termesztésbe vonása i.e. 2000 évvel ezelőtt kezdődhetett, Európában csak a középkor óta ismert.

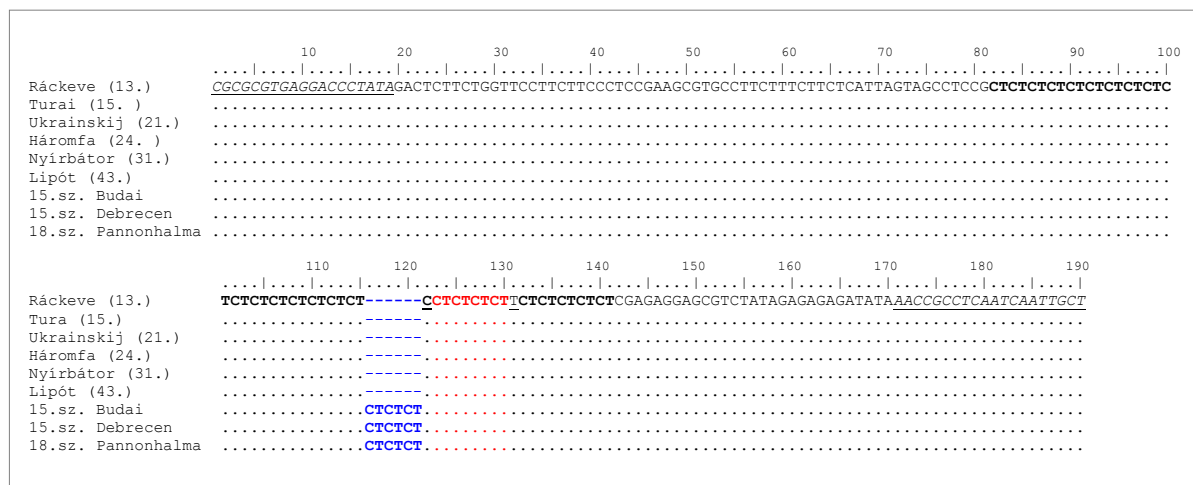
A régészeti genetika, illetve botanika speciális területe a nagyszámú piramaisokból előkerült görögdinnye-maglelet, különös tekintettel a leghíresebb Tutan-kamon-i ásatásokra. A nagyszámú magyarországi középkori magleletek szerint (Gyulai et al. 2006; Tóth, Gyulai et al. 2007) a görögdinnye (*Citrullus lanatus*) és a sárgadinnye (*Cucumis melo*) különösen kedvelt konyhakerti növények voltak már a középkorban (Hartyányi, Nováki 1975). A középkori Magyarországon termesztett görögdinnyék többnyire *sárgabelűek* lehettek egészen a 18. sz.-ig (Gyulai F vizsgálati eredménye), a pirosbelű fajták csak a törökkor elmúlása után kezdtek terjedni. Itáliában viszont a piros belű fajták már a 16. században közkedveltek lehettek, ahogy ezt Cavaraggio (*Still life with fruit on a Stone Ledge and carafe of white wine*; and *Still life with melon, watermelon, pomegranate, grape and other fruits*, Pensionaute del Saraceni, 1603) festményei igazolják (J. Janick, www.hort.purdue.edu;

A vizsgálatainkban két 15. századi ásatásból származó maglelet, a Budai királyi vár Zsigmond-kori szárnyának (15. sz. eleje) régészeti feltárásaiból (Gyulai et al. 2006)-, illetve a debreceni Kölcsey Művelődési Központ területén végzett ásatásokból származik, a 18. századi mintát az un. Pannonhalmi Apátság botanikai gyűjteményéből (Mezőgazdasági Múzeum, Budapest) származik. A 44 mai fajtát az Agrobotanikai Központ, Tápiószele, génbanki anyagából (Tóth, Gyulai et al. 2007) gyűjtöttük össze. A magleletekből és a mai görögdinnye fajtákból DNS-izolálást, molekuláris (nSSR – nuclear simple sequence repeat; cpDNS – kloroplasztisz DNS) elemzést, és retroranszpozon izolálást végeztünk

Szekvencia-elemzés: (ct)₃ delécio és (ct)₄ inverzió a (ct)₂₇ görögdinnye (Citrullus lanatus) mikroszatellita lokuszán a középkor óta

A vizsgálatokhoz mikroszatellita primer párokat alkalmaztunk. Az elemzésben 47 primer-párt teszteltünk, ebből 26 primer-pár bizonyult hatékonynak a mai fajtákban, amelyek közül 16 volt aktív a középkori mintában, és szekvencia elemzést végeztünk a CI-1-20 (CT)₂₆₋₃₀ nSSR lokuszon. Megállapítottuk, hogy mindhárom régészeti mintában még megtalálható (CT)₃ (115-121 nt) SSR szekvencia szakasz a mai fajtákban delécioval kiesett az elmúlt 600 év során. A (CT)₂₆₋₃₀ nSSR lokusz (190 bp) 122-130 bp szakaszán egy további (CT)₄ inverziót is azonosítottunk, a régészeti és a mai fajtákban (6. ábra). Ez az eredmény (CT)₂₇ egyszerű mikroszatellita lokuszból kialakuló (CT)₁₇-C-(TC)₄-T-(CT)₅

összetett mikroszatellita születését igazolja, amely eredmény a mikroszatellita lokuszok evolúciójának jelentős eredménye (ld. „mikroszatelliták születése és halála”).



6. ábra. (CT)₃-deléció (115-121 nt) a dinukleotid (CT)₂₆₋₃₀ nSSR (Cl.1-20; Jarret et al. 1997) mikroszatellita (82-141 nt) lokuszon (190 bp) a vizsgált mai görögdinnye (*Citrullus lanatus*) fajtákban a 15.századi és a 18.századi minták összehasonlításában; valamint összetett mikroszatellita születése egy feltételezhető ősi szekvenciából levezethetően a (CT)₄ szakasz inverziójával (122-130 nt) mindegyik mintában (a primereket aláhúzás jelzi) (Tóth, Gyulai *et al.* 2007).

LTR retrotranszpozonok izolálása görögdinnyében

A növényi transzpozonok, retroelemek, ugráló gének: Az eukarióta és a prokarióta genom igen nagy mennyiségű vírus-eredetű DNS-t hordoz, amelyek önszaporodásra, helyváltoztatásra (transzpozíció) képesek (*transposable elements*, TE-k), ezáltal nagy szerepet játszanak a mikro/evolúcióban. Az áthelyeződő gének (transzpozíciós elemek – TE; transzpozonok; a prokariotákban Inszerciós Szekvenciák - IS) a genomból ki tudnak vágódni, majd áthelyeződni a genom egy másik pontjára és ott újból beépülni (Olasz *et al.* 1997). Felfedezésük nem baktériális, humán- vagy állatgenetikai kutatásokhoz kötődik, hanem tisztán növénygenetikai eredmény: kukoricában (*Zea mays*) fedezte fel Barbara McClintock (1942; Nobel-díj 1983). Az evolúció során a sejtben legnagyobb mennyiségben előforduló tRNS a mt-tRNS-t felhasználó retroelemek szaporodtak fel legnagyobb számban a genomokban. A met-tRNS 3'-végi, aminosav kötő tripletje CCA, melynek komplementer szekvenciája a PBS-ben GGT. A tervezett PBS-specifikus primereink 3'-vége ezért minden esetben a CCA volt (Kalendar, Schulman 2006). Összesen 51 PBS primert teszteltünk melyből mindegyik mutatott amplifikációt. Mind a két 15. századi, és a 18. századi mintában is sikerült kimutatni retrotranszpozon eredetű fragmentumokat, még a nagy mol tömegű (3 Kbp) frakciókban is.

LTR retrotranszpozon izolálása, klónozása és szekvenálása

Új LTR retrotranszpozonok izolálásához klónoztuk a PBS fragmentumokat, majd kolónia PCR-ben amplifikáltuk, pGEM-T easy vektorba ligáltuk, *E. coli* baktériumba klónoztuk, majd plazmidot tisztítottunk és univerzális primerekkel az inszerteket megszekvenáltuk. Összesen 30 klónt szekvenáltunk (20.997 nt), melyek közül 18 szekvencia (60 %) mutatott LTR eredetű az általános LTR szekvencia alapján (*primer-CCAnnnTGCGnnn...*). A 18 LTR szekvencia lehetséges teljes hosszának további amplifikálására 34 IRAP (*Inter Retrotransposon Amplification Polymorphism*) (Kalendar, Schulman 2006) primert terveztünk, melyek mindegyike alkalmas volt LTR alapú IRAP-polimorfizmus meghatározására görögdinnye fajták között. Az LTR-retrotranszpozon szekvenciák (1-18) BLAST elemzésében génkapcsoltságot találtunk a leírt szekvenciák között, ugyanis a retroelemek nagy számban épülnek be funkcionális gének promotor közeli szekvenciáiba. A görögdinnye teljes genom szekvenciája messze nem ismert, azonban a BLAST elemzésünk során a 18 szekvenciából három LTR-retrotranszpozon mutatott génkapcsoltságot. Az egyik (2251. sz.) LTR retrotranszpozon szekvenciájának (1.163 nt) 284 nt hosszú szakasza megtalálható volt a görögdinnye gyümölcs magi nucellusz-specifikus fehérje gén (WM403) határoló (flanking) szekvenciájába épülve (AF008925) (1.711-1.408 nt). A 284 nt hosszú retrotranszpozon szekvencia elemzése (dot plot) azt igazolta, hogy TRIM (*terminal repeat retrotransposon in miniature*) típusú szülő-LTR-t azonosítottunk, elsőként a görögdinnye genomában (Tóth, Gyulai *et al.* 2007).

Az új LTR retrotranszpozon a *CiLa-1* (*Citrullus lanatus*) elnevezést kapta, az NCBI adatbázisába feltöltöttük. A másik LTR-klón 1.070 nt hosszú (2296 primer) szekvenciájának 286 nt szakaszát (107 – 393 nt) szintén egy *Cucurbitaceae* faj, a tök (*Cucurbita maxima*) floém fehérje (PP1) (NCBI U66277) génjébe ágyazottan találtuk.

4. Új tudományos eredmények – A gyakorlati alkalmazás lehetőségei

1.

Az ivaros- (pollen, portok, ovárium és ovulum), valamint a vegetatív biotechnológiai módszerek (mikroszaporítás, klónozás, szomaklónok, protoklónok, cibridek) segítségével új klóntípusok állíthatók elő a növénynemesítés számára: *szomaklónokat* (Poaceae); *gametoklónokat* (paprika, fekete nyár), *vegetatív klónokat* (szürkenyár) és DHAC-indukált *epigenetikai klónokat* (szürkenyár). Igazoltam a szomatikus embriógenesis folyamatát szkennig elektron mikroszkópos (SEM) elemzéssel egy és kétszikű fajokban: sziki mézpázsitban (*Puccinellia limosa*); vadgesztenyében (*Aesculus hippocastanum*), és szójában (*Glycine soja*). További fajok elemzésére, helyszűke miatt, csak utaltam: új tarackbúza klón (*Agropyron repens* cv. *Purdue*) és lignintartalomban csökkentett zöld pántlikafű (*Phalaris arundinacea*) klónok előállítására, valamint az ivarsejt eredetű, dihaploid paprika (*Capsicum annuum*) klónok molekuláris elemzésére.

2.

Igazoltam a fitoremediációs célra előállított *gsh1*-transzgénikus szürkenyár klónok (11ggs, 6lgl) 35S-*gshI*-klónstabilitását 682 AFLP-fragmentum kimutatásával. Hatékony génexpresszió növekedést értem el a *gshI*-transzgén, valamint a nyárfa endogén *gsh1* gének aktivitásában DHAC-indukált demetilálóval: a 6lgl-klónban a *gshI*-transzgén expressziója 1.8-szorosára, míg a nyárfa saját *gsh1* génjének expressziója 8.7-szeresére emelkedett; a kontroll WT-klónban 19.7-szeresére nőtt az endogén *gsh1* nyárfagén aktivitása. Eredményeimmel egyben alternatív módszer lehetőségét adtam a GMO – kontra nem-GMO kérdéshez.

3.

Új mikroszatellita klóntípusokat azonosítottam feketenyárban (*Populus nigra*) 35 haploid eredetű klón populációjában, öt SSR lokusz, 20 SSR allél 280 szekvenciája alapján. Az SSR polimorfizmus egyik okaként, a nyárfa wpms-20 lókuszán egy 5-szörös (ctgggt)₅ szekvencia-deléciót mutattam ki a (ttctgg)₈ lokuszon, igazolva a gametoklónális variabilitás molekuláris fixálásának lehetőségét.

4.

A növényi archeogenetikai kutatásokban a köles, sárgadinnye és görögdinnye régészeti leleteinek feldolgozását végeztem el. A köles (*Panicum miliaceum*) archaeogenetikai elemzésében molekuláris régészeti kormeghatározási módszer lehetőségét írtam le az AFLP-lokuszek degradáció mértékének meghatározásával 1.600-, és 600 éves köles magleletek ősdNS mintáiban (2 AFLP fragmentum /4. századi; 158 AFLP fragmentum / 15.századi és 264 AFLP fragmentum / mai fajta). Az ISSR fragmentum elemzéssel fajtarekonstrukciós módszert dolgoztam ki 600-éves köles ősdNS mintája alapján, 20 mai fajta 7 ISSR lokusz 157 ISSR allél összehasonlításával.

5. A középkori (600 éves) sárgadinnye (*Cucumis melo*) maglelet DNS mintájának fajtaspecifikus ITS1-5.8S-ITS2 szekvencia elemzésével molekuláris módszert dolgoztam ki a régészeti leletek kereszt-fertőzött mintáinak kiszűrésére. Valamint, 8 SSR lokusz 40 allél, 485 fragmentum szekvenciájának meghatározásával fajtarekonstrukciót végeztem 600 éves sárgadinnye fenotípusának meghatározásában.

6.

Középkori (600 éves) görögdinnye (*Citrullus lanatus*) sejtmagi és kloroplasztisz (cpDNS) ősdNS mintáinak valamint a mai fajták összehasonlító elemzésében új rDNS-ITS és haplotípus csoportokat határoztam meg. Valamint, a mikroszatellita DNS szakaszok evolúciója kérdésében, kísérletesen igazoltam, hogy a 600 éves domesztikációs idő során egyszerű SSR szekvenciákból hogyan alakul ki összetett mikroszatellita a (CT)₂₇ egyszerű mikroszatellita lokuszon a (CT)₁₇-CC-(TC)₃-TT-(CT)₄ szekvencia kialakulásával. Görögdinnyében (*Citrullus lanatus*) leírtam a görögdinnye első LTR-retrotranszpozonját (*Cila1*; NCBI EU009625), amely új marker rendszert nyújt a molekuláris fajtaazonosítás számára.

5. Irodalomjegyzék

- Arisi A-C M, G Noctor G, CF Foyer, L Jouanin L (1997) Modification of thiol contents in poplars (*Populus tremula* x *P. alba*) overexpressing enzymes involved in glutathione synthesis. *Planta* 203:362-372.
- Bacsó R, F Facsar, F Gyulai, GyD Bisztray, I Velich (2004) Examinations of 600-year-old seeds by means of archaeobotanical and genetical methods. *Int J Hort Sci* 10:79-80.
- Balázs E, Bouzoubaa S, Guille H, Jonard G, Paszkowski J, Richards K (1985) Chimeric vector construction for higher-plant transformation. *Gene*. 1985; 40: 343-348.
- Bálint A (1996) A brief history of the theory, methodology and application of mutation research. *Acta Agronomica* 44:93-107.
- Barna B, L Ádám L, Z Király (1993) Juvenility and resistance of a superoxide-tolerant plant to diseases and other stresses. *Naturwissenschaften* 80: 420-422.
- Barnabás B, Obert B, Kovács G (1999) Colchicine, an efficient genome doubling agent for maize (*Zea mays* L.) microspores cultured in anthero. 18: 858-862.
- Binh DQ, LE Heszky, **Gyulai G**, A Csillag (1992) Plant regeneration of NaCl-selected embryogenic cells from long-term suspension culture of rice (*Oryza sativa* L.) in saline conditions. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 29:75-82.
- Binh DQ, LE Heszky, **Gyulai G**, E Kiss, A Csillag (1989) Plant regeneration from callus of *Puccinellia distans* (L.) Parl. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 18:195-200.
- Bisztray GyD, R Bacsó, P Bodor, G Facsar, F Gyulai, I Velich (2004a) Archaeobotanical and genetical methods to analyse 600-years-old seeds of horticultural plants. 5th IVCHB Symposium, In Vitro Culture and Horticultural Breeding, 12-17. September 2004, Debrecen, Hungary, Book of Abstracts Eds.: *Fári MG, I Holb*, 212.p.
- Bisztray GyD, P Bodor, R Bacsó, G Facsar, F Gyulai, I Velich (2004b) Microsatellite investigations on archaeobotanical grape seeds. 5th IVCHB Symposium, In Vitro Culture and Horticultural Breeding, 12-17. September 2004, Debrecen, Hungary, Book of Abstracts. Eds.: *Fári MG, I Holb*, 213 p.
- Bitsánszky A, T Kőmives, G Gullner, **Gyulai G**, J Kiss, L Heszky, L Radimsky, H Rennerberg (2005a) Ability of transgenic poplars with elevated glutathione content to tolerate Zinc (Zn²⁺) stress. *Environment International* 31:251-254.
- Bitsánszky A, **Gyulai G**, G Gullner, J Kiss, Zs Csintalan, Z Szabó, R Lágler, T Kőmives (2005b) Stress tolerance and in vitro phytoremediation of poplar (*Populus*). *Hung Agric Research* 2005/1:13-15.
- Bitsánszky A (2006) A gsh1-transzgenikus szürkenyár stresszindukciója Zn²⁺ és paraquat tesztben; feketenyár sejtklónok SSR diverzitása. PhD Disszertáció, SzIE Gödöllő. Témavezető: **Gyulai G**.
- Bitsánszky A, **Gyulai G**, M Humphreys, G Gullner, Zs Csintalan, J Kiss, Z Szabó, R Lágler, Z Tóth, H Rennerberg, L Heszky, T Kőmives (2006) RT-PCR analysis and stress response capacity of transgenic gsh1-poplar clones (*Populus x canescens*) in response to paraquat exposure. *Z. Naturforschung* 61c:699-730.
- Bitsánszky A, **Gyulai G**, RP Malone, G Gullner, J Kiss, M Czako, P Lohoczky, L Márton, L Heszky, T Kőmives (2007a) Triggering of a plant molecular defense mechanism; gene expression levels of transgene gsh1 and poplar gene gsh1 (*Populus x canescens*) in response to the DNA demethylating drug DHAC – an qRT-PCR analysis. *Acta Phytopathol Entomol Hung* 42:235-243.
- Bitsánszky A, **Gyulai G**, Kiss J, Gullner G, Heszky L, Kőmives T (2007b) Feketenyár (*Populus nigra*) gametoklónok mikroszatellita változatossága; (TTCTGG)₅ deléció a WPMS-20 lokuszon. *Ágrártudományi Közlemények* 27: 60-67.
- Bodor P, T Deák, R Bacsó, I Velich, Gy D Bisztray, G Facsar, F Gyulai (2004) Morphological and genetic investigation of medieval grape seeds. Proceedings of the 5th In Vitro Culture and Horticultural Breeding Symposium, 12-17. september 2004, Debrecen, Hungary. (ISHS 725)
- Bogacsi-Szabó E, T Kalmár, B Csányi, Gy Tömöry, Á Priskin, F Horváth, CS Downes I Raskó (2006) Mitochondrial DNA of ancient Cumanians: Culturally asian steppe nomadic immigrants with substantially more western Eurasian mitochondrial DNA lineages. *Hum Biol* 77:639-662.
- Bordács S, A Borovics, I Bach (2002) Genetic diversity of natural populations and gene bank of black poplar in Hungary. Pp 93-106 In Genetic Diversity in River Populations of European Black Poplar - Implications for riparian eco-system management (BC Van Dam, Bordács S, eds.). Csiszár Nyomda, Budapest, Hungary.
- Briggs R, King TJ (1952) Transplantation of Living Nuclei from Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc National Acad Sci USA* 38:, 455-463
- Cao X, NM Springer, MG Muszynski, RL Phillips, S Kaeppler, SE Jacobsen (2000) Conserved plant genes with similarity to mammalian de novo DNA methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4979-4984.
- Cekic C, NH Battey, MJ Wilkinson (2001) The potential of ISSR-PCR primer-pair combinations for genetic linkage analysis using the seasonal flowering locus in *Fragaria* as a model. *Theor Appl Genet* 103:540-546.
- Digby L (1912). The cytology of *Primula kewensis* and of other related *Primula* hybrids. *Ann Bot* 26, 357-388.
- Dudits D, Bögre L, Györgyey J (1991) Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *Journal of Cell Science* 99: 475-484.
- Dudits D, Heszky L (2000) Növényi biotechnológia és géntechnológia. Agroiinform Kiadóház Rt. Budapest.
- Dudits D, Heszky L (2003) Növényi biotechnológia és géntechnológia. Agroiinform Kiadó, Budapest. Második, átdolgozott, bővített kiadás.
- Erekly K (1919) Biotechnologie der Fleisch-, Fett- und Milcherzeugung im landwirtschaftlichen Grosbetrieb. Verlag Paul Parey, Berlin. 84p.
- Fári M (1982) Új lehetőség: a szövettenyésztés. (In: *Velich I.*, szerk.): Válság, vagy egyensúly? Mezőgazdasági Könyvkiadó, Budapest, 201-238.
- Fári MG, Kralovszky UP (2006) The founding father of biotechnology: Károly (Karl) Erekly. *Int J Hort Sci* 12 (1): 9-12.
- Fehér A, Pasternak T, Dudits D (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 74: 201-228.
- Fletcher HA, HD Donoghue, G M Taylor, AGM van der Zanden, M Spigelman (2003) Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* DNA from a family of 18th century Hungarians. *Microbiology* 149: 143-151.
- Galiba G, Kovacs G, Sutka J (1986) Substitution analysis of plant regeneration from callus culture in wheat. *Plant Breeding* 97:261-263.
- Galiba G, Kocsy G, Kerepesi I, Vágújfalvi A, Cattivelli L, Sutka J (2002) Involvement of glutathione and carbohydrate biosynthesis moreover *cor14b* gene expression in wheat cold acclimation. pp. 139-160. In: *Plant Cold Hardiness: Gene Regulation and Genetic Engineer*. Eds: PH Li and T Palva. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Garcia-Mas J, AJ Monforte, P Arús (2004) Phylogenetic relationships among *Cucumis* species based on the ribosomal internal transcribed spacer sequence and microsatellite markers. *Plant Syst Evol* 248: 191-203.
- Gémesné JA, **Gyulai G**, M Petus, G Venczel, Zs Sági, L Zatykó (2000) DH-breeding of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). Biotechnological approaches for utilization of gametic cells. (ed. B. Bohanec). COST Action 824, pp.157-159. ISBN 92-894-0225-3.
- Gémesné JA, M Petus, G Venczel, L Zatykó, **Gyulai G**, M Cséplő (2001) Genetic variability of anther donor versus spontaneous doubled haploid descendents and colchicine induced doubled haploid sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) lines. *Acta Hort* 560:149-152.
- Gencsi L, Vancsura R (1992) Dendrológia. pp 1-728. Mezőgazda Kiadó, Budapest. ISBN 963 81 6008 X
- Gullner G, T Kőmives (1998) A glutation szerepe növény-kórokozó kölcsönhatásokban. *Biokémia* 22:83-88.
- Gullner G, **Gyulai G**, A Bitsánszky, J Kiss, L Heszky, T Kőmives (2005) Enhanced inducibility of glutathione s-transferase activity by paraquat in poplar leaf discs in the presence of sucrose. *Phyton* 45:39-44.
- Györgyey J, Gartner A, Németh K, Magyar Z, Hirt H, Heberle-Bors E, Dudits D (1991) Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. *Plant Mol Biol* 16: 999-1007.
- Gyulai G**, J Janovszky, E Kiss, L Lelik, A Csillag, LE Heszky (1992a) Callus initiation and plant regeneration from inflorescence primordia of the intergeneric hybrid *Agropyron repens* (L.) Beauv. x *Bromus inermis* Leyss. cv. *nanus* on a modified nutritive medium. *Plant Cell Rep* 11: 266-269.
- Gyulai G**, LE Heszky, E Kiss, Zs Jekkel, KT Lőkös (1992b) Eljárás biológailag aktív anyagok auxin, illetve citokinin aktivitásának szelektív meghatározására. *Magyar Szabadalom*, 204360).
- Gyulai G**, E Kiss, LE Heszky (1992c) Biotechnology of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Acta Agron Hung* 41:277-287.
- Gyulai G**, E Kiss, A Csillag, LE Heszky (1993a) Developmental analysis of primary and secondary somatic embryogenesis in soybean tissue culture. *Acta Biol Hung* 44:189-196.
- Gyulai G**, E Kiss, LE Heszky (1993b) A repce biotechnológiája. in Magyarország Kultúrflórája. VI. ed. Szabó L. Az olajrepce - *Brassica napus*. pp. 56-62. Akadémiai Kiadó, Bp.
- Gyulai G**, E Kiss, J Kiss, LE Heszky (1993c) Hormone-Selective Bioassay for Auxins and Cytokinins *in vitro*. *Hung Agric Res* 2:13-17.
- Gyulai G**, Z Jekkel, E Kiss, J Kiss, L E Heszky (1995a) A selective auxin and cytokinin bioassay based on root and shoot formation *in vitro*. *J Plant Physiol* 145: 379-382.
- Gyulai G**, LE Heszky (1995b) Auxin and cytokinin bioassays. A short overview. *Acta Agron Hung* 43:185-189.

- Gyulai G, L Murenietz, J Janovszky, M Tárczi, I Rácz (1995c) Initiation of monocot plant development In vitro for studying plant-microbe interaction. . pp.155-159. In Azospirillum VI. and related microorganisms. Genetics, Physiology, Ecology. (Eds) I Fendrik, M del Gallo, J Vanderleyden, M. de Zamaroczy. NATO ASI Series, Vol G37. Berlin, New York, Springer-Verlag.
- Gyulai G, I Dweikat, J Janovszky, H Ohm, E Kiss, H Sharma, LE Heszky (1997) Application of ISSR/SSR-PCR for genome analysis of Agropyron, Bromus, and Agropyron x Bromus. In: Z.Staszewski, W Mlyniec, R Osinski (eds) Ecological aspects of breeding fodder crops and amenity grasses, PBAI, Radzikow, Poland, pp.306-312.
- Gyulai G (1999a) Biotechnológiai növénytermesztés, biológiai alapok. In. Training for EU Accession to the Hungarian Agroadministration, TEMPUS 13321-98. Chapter IV. pp.1-34.
- Gyulai G, JA Gémesné, Zs Sági, L Zatykó, L Heszky, G Venczel (1999b) PCR analysis of F₁ hybrid derived DH pepper lines. Capsicum and Eggplant Newsletters 18: 40-43.
- Gyulai G, L Szemán, A Idnurm, L Heszky, J Janovszky (2000a) Fibre content analysis of reed canary grass (*Phalaris arundinacea* L.) somaclones. In: Soegaard K et al. (eds) Grassland Science in Europe, EGF, Vol.5, pp. 244-246. ISBN 87-88976-45-9.
- Gyulai G, Gémesné JA, Zs Sági, G Venczel, P Pintér, Z Kristóf, O Törjék, L Heszky, S Bottka, J Kiss, L Zatykó (2000b) Doubled haploid development and PCR-analysis of F₁ hybrid derived DH-R₂ paprika (*Capsicum annuum* L.) lines. J Plant Physiol 156:168-174.
- Gyulai G, A Magda, J Kiss, F Gyulai, L Holly, L Heszky (2001) DNS izolálás és PCR-amplifikáció 700 éves növény magvakból. VII. Növénytermesztési Tudományos Napok, Budapest, p.89.
- Gyulai G, Mester Z, Kiss J, Szemán L, Heszky L, Idnurm A (2003a) Somaclone breeding of reed canarygrass (*Phalaris arundinacea* L.). Grass and Forage Science 58, 210-215.
- Gyulai G, Z Szabó, K Penszka, J Kiss, L Heszky (2003b) Új kékesperje (*Poa humilis*) genotípusok klónozása és molekuláris jellemzése. Gyepgazdálkodás 2001 (ed. G Nagy), Debrecen, ISBN 963 9274 15 1, pp. 78-80.
- Gyulai G, Kiss E, Heszky L (2004) Az árpa biotechnológiája. in Magyarország kultúrlőrája. VIII/14. pp. 274-289. (Eds.) L. Tomcsányi, G Turcsányi. Az árpa - *Hordeum vulgare* L., Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Gyulai G, M Humphreys, A Bittsánszky, K Skot, J Kiss, L Skot, G Gullner, S Heywood, Z Szabó, A Lovatt, L Radimsky, H Roderick, M Abberton, H Rennerberg, T Kőmives, L Heszky (2005) AFLP analysis and improved phytoextraction capacity of transgenic gshl-poplar clones (*Populus canescens* L.) in vitro. Z. Naturforschung 60c:300-306.
- Gyulai G, M Humphreys, R Lagler, Z Szabó, Z Toth, A Bittsánszky, F Gyulai and L Heszky (2006) Seed remains of common millet from the 4th (Mongolia) and 15th (Hungary) centuries; AFLP, SSR, and mtDNA sequence recoveries. Seed Science Research 16:179-191.
- Gyulai G (2007) DHAC-indukált DNS-demetiláció és transzgen-reaktiváció gshl-transzformáns szűrkenyár (*Populus x canescens*) klónokban; génkompetíció RT-qPCR elemzése. Agrártudományi Közlemények 27: 78-83.
- Gyulai G, Z Tóth, A Bittsánszky, Z Szabó, G Gullner, J Kiss, T Kőmives and L Heszky (2008) Gene up-regulation by DNA demethylation in 35S-gshl-transgenic poplars (*Populus x canescens*). in: Genetically Modified Plants: New Research Trends. Eds. T Wolf and J Koch, Nova Science Publisher, Inc. USA, Chapter 8, pp. 173-191. ISBN 978-1-60456-696-3.
- Gyurján I; Korányi P; Preininger E; Varga SS; Paless G (1995) Artificial plant-Azotobacter symbiosis for atmospheric nitrogen fixation. Pp.401-413. In. Azospirillum VI and related microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology. (Eds) I Fendrik, M del Gallo, J Vanderleyden, M. de Zamaroczy. NATO ASI Series, Vol G37. Berlin, New York, Springer-V.
- Haberlandt G (1902) Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sb. Akad. Wiss. Wien, Math.-Nat. Cl., 111 Abt. 1: 69-91;
- Haberlandt G (1913) "Zur Physiologie der Zellteilung". Sitzber. K. Preuss. Akad. Wiss. 318.
- Hagelberg E, Sykes B, Hedges R (1989) Ancient bone DNA amplified. Nature 342:485.
- Hartyányi P, B Nováki (1975): Samen- und Fruchtfunde in Ungarn von der Jungsteinzeit bis zum 18. Jahrhundert. Agrártört. Szeml. 17, 1-22. Supplementum.
- Heszky LE, DQ Binh, E Kiss, Gyulai G (1989a): Increase of green plant regeneration efficiency by callus selection in *Puccinellia limosa* Schur., Holmbg. Plant Cell Rep 8:174-177.
- Heszky LE, Li SN, I Simon-Kiss, K Lőkös, Gyulai G, E Kiss (1989b) Organ-specific and ploidy-dependent somaclonal variation; a new tool in breeding. Acta Biol Hung 40:383-394.
- Heszky L, Fésüs L, Homok L (2005) Mezőgazdasági biotechnológia (eds) Agroinform Kiadóház, Budapest
- Higuchi R, Bowman B, Freiberger M, Ryder OA, Wilson AC (1984) DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. Nature 312, 282-284.
- Hódos-Kövics G, L Heszky (1989) Noventa, szuperkorai szója mutáns. Magyar Szabadalom, 207922/1989
- Homok L (2000) Genetikailag módosított mikroorganizmusok a biológiai növényvédelemben. Növényvédelem 36: 229-237.
- Horváth L, Gyulai G, Szabó Z, Lagler R, Tóth Z, Heszky L (2007) Morfológiai diverzitás a sárgadinnyében (*Cucumis melo*); egy középkori típus fajtarekonstrukciója. Agrártudományi Közlemények 27: 84-90.
- Jekkel Z, Gyulai G, LE Heszky (1995) Cryopreservation of some halophyte grasses (*Puccinellia* species). in. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 32., Cryopreservation of plant germplasm I. ed. Y.S.P. Bajaj, Springer V, Berlin-New York, pp. 245-255.
- Jekkel Zs, Gyulai G, J Kiss, E Kiss, L Heszky (1998) Cryopreservation of horse-chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) somatic embryos using three different freezing methods. Plant Cell Tissue Organ Cult 52:193-197.
- Jekkel Zs, J Kiss, Gyulai G, E Kiss, L Heszky (2002) Cryopreservation of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.). in. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.50., Cryopreservation of plant germplasm II. ed. Y.S.P. Bajaj, Springer V, Berlin-New York, pp.192-212.
- Kalendar R, Schulman HA (2006) IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. Nature Protocols 1:2478-2484.
- Kalmár T, CZ Bachraty, A Marcsik, I Rasko (2000) A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones. Nucleic Acids Res. 28(12):E67.
- Karpechenko G D (1927) Polyploid hybrids of *Raphanus sativus* X *Brassica oleracea* L. Bull. Appl. Bot. 17, 305-408.
- Kevey B (1999) Feketenyár-ligetek Vörös könyv Magyarország növényársulásairól 2., TermészetBÚVÁR Alapítvány Kiadó p. 121-123.
- Király Z, Klement Z (1968) A növényi betegségellenállóság élettana. Akadémiai Kiadó, Budapest, 138p.
- Kiss E, Gyulai G, Heszky L (2004) Az árpa genetikája. in Magyarország kultúrlőrája. VIII/14. pp. 256-273. (Eds.) L. Tomcsányi, G Turcsányi. Az árpa - *Hordeum vulgare* L., Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Kiss J, LE Heszky, E Kiss, Gyulai G (1992) High efficiency adventive embryogenesis on somatic embryos of anther, filament and immature proembryo origin in horse-chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) tissue culture. Plant Cell Tissue Organ Cult 30:59-64.
- Kiss J, M Kondrák, O Törjék, E Kiss, Gyulai G, K Mázik-Tőkei, L Heszky (2001) Morphological and RAPD analysis of poplar trees of anther culture origin. Euphytica 118:213-221.
- Kocsy G, Szalai G, Galiba G (2004) Effect of osmotic stress on glutathione and hydroxymethylglutathione accumulation in wheat. J Plant Physiol 161:785-794.
- Kőmives T, Gullner G, Király Z (1998) Role of glutathione and glutathione-related enzymes in response of plants to environmental stress. In Stress of Life. From Molecules to Man, vol. 851 (Szerk: Csemely P.), pp. 251-258. New York, USA: The New York Academy of Sciences.
- Kőmives T, Gullner G, Rennerberg H, Casida JE (2003) Ability of poplar (*Populus* spp.) to detoxify chloroacetanilide herbicides. - Water Air Soil Poll. Focus 3:277-283.
- Lágler R, Gyulai G, M Humphreys, Z Szabó, L Horváth, A Bittsánszky, J Kiss, L Holly, L Heszky (2005) Morphological and molecular analysis of common millet (*P. miliaceum*) cultivars compared to an aDNA sample from the 15th century (Hungary). Euphytica 146:77-85.
- Lágler R, Gyulai G, Z Szabó, Z Tóth, A Bittsánszky, L Horváth, J Kiss, F Gyulai, L Heszky (2006) Molecular diversity of common millet (*P. miliaceum*) compared to archaeological samples excavated from the 4th and 15th centuries. Hung Agric Res 2006/1:14-19.
- Lágler R, Gyulai G, Szabó Z, Tóth Z, Heszky L (2007) A köles (*Panicum miliaceum*) SSR-, ISSR- és mtDNS szekvencia-stabilitása a 4.- és 15. századi régészeti leletektől a mai fajtáig. Agrártudományi Közlemények 27: 10-19.
- Lágler R (2007) A köles (*Panicum miliaceum*): ISSR and SSR szekvencia stabilitása középkor óta. PhD Értekezés. SzIE, Gödöllő. Témavezető: Gyulai G.
- Larkin PJ, Scowcroft WR (1981) Somaclonal variation - a novel source of variability from cell culture for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60:197-214.
- Lehoczi E, Laskay G, Gaál I, Szigeti Z (1992) Mode of action of paraquat in leaves of paraquat-resistant *Coryza canadensis* (L.) Cronq., Plant Cell Environ. 15:531-539.
- Leple J-C, Pilate G, Jouanin L (2000) Transgenic poplar trees (*Populus* species). In: Bajaj YPS, ed. Biotechnology in agriculture and forestry 44:transgenic trees. Heidelberg, Germany: Springer, pp. 221-244.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. Methods 25, 402-408.
- Maliga P (1995) In: Maliga P, Klessig DF, Cashmore AR, Gruissem W, Varner JE (eds), Methods in Plant Molecular Biology: A Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY., pp. 95-110.
- Maróti M (1976) A növényi szövettan és sejttan alapjai. Akadémiai Kiadó, Budapest
- Mátyás Cs (2006) Erdészeti génmegőrzési program: feladatok és megvalósítás. Kézirat. Sopron
- Mázik-Tőkei K, Lelley T, Gyulai G, Kiss E, Heszky LE (1997) Meiotic- and RAPD analysis of a dwarf type of *Agropyron repens* L. Cereal Research Communications, 25: 127-133.

- McClintock B (1942) The fusion of broken ends of chromosomes following nuclear fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 28: 458–463.
- Mende BG (2006) Possibilities and limitations in the archaeogenetic analysis of ancient human remains. *Archeometriai Műhely* 2006/1:29-33.
- Mendel G (1865) Versuche über Pflanzenhybriden. *Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn*, Bd. IV für das Jahr 1865, Abhandlungen, 3–47.
- Mészáros A, A Bellon, É Pintér, G Horváth (1999) Micropropagation of lemon balm. *Plant Cell, Tissue Organ Cul.* 57: 149–152.
- Mester Z, **Gyulai G**, J Janowszky, TM Hangyel, M Tar, S Bottka, L Heszky (1998) Development and genetic analysis of new somaclones of Reed Canarygrass (*Phalaris arundinacea* L.). In: Nagy G, K Pető (eds) *Grassland Science in Europe*, EGF, Vol.3. pp. 791-794. ISBN 963-7177-82-5.
- Miller CO, Skoog F, von Saltz MH, Strong FM (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 77:1392.
- Molnár B (1973) A sárgadinnye. Akadémiai Kiadó, Budapest, pp.263.
- Morel G, Martin C (1952) Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. *C.R. Acad. Sci.* 235:1324-1325.
- Morgan TH (1910) Sex-limited inheritance in *Drosophila*. *Science* 32: 120-122.
- Muller HJ (1927) Artificial transmutation of the gene. *Science* 66: 84–87.
- Murashige T, F Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Nagy J (2003a) A magyar görög- és sárgadinnye. In: *Kertészeti hungarikumok*. Szerk. Nyéki, J., Papp, J. pp. 84–96. MTA Társadalomkutató Központ, Budapest.
- Nagy J (2003b) A görögdinnye, sárgadinnye és az uborka szabadföldi termesztése. *Östermelő* 7 (1): 71–76.
- Nebel BR, ML Rattle (1938) Action of colchicine on mitosis. *Genetics* 23:315-76
- Noctor G, A-C M Arisi, L Jouanin, CH Foyer (1998) Manipulation of glutathione and amino acid biosynthesis in the chloroplast. *Plant Physiology* 118:471-482.
- Olasz F, T Farkas, J Kiss, A Arini, W Arber (1997) Terminal Inverted Repeats of Insertion Sequence IS30 Serve as Targets for Transposition. *J Bacteriology* 179: 7551–7558.
- Orsós O (1941) Die Gewebeentwicklung bei der Kohlrabiknolle. *Flora* 35: 6–20.
- Overbeek van J, Conklin ME, Blakeslee AF (1941) Factors in coconut milk essential for growth and development of *Datura* embryos. *Science* 94:350.
- Pääbo S (1985) Molecular-Cloning of Ancient Egyptian Mummy DNA. *Nature* 314:644-645.
- Paál A (1918) "Über phototropische Reizleitung". *Jahrb. Wiss. Bot.* 58:406-458.
- Pauk J, Manninen O, Mattila I, Salo Y, Pulli S (1991) Androgenesis in Hexaploid Spring Wheat F2 Populations and Their Parents Using a Multiple-Step Regeneration System. *Plant Breeding* 107:18-27.
- Páy A, Heberle-Bors E, Hirt H (1992) An alfalfa cDNA encodes a protein with homology to translationally controlled human tumor protein. *Plant Mol Biol* 19:501–503.
- Pumhauser L, **Gyulai G** (1993) The effect of copper on the shoot and root regeneration in wheat, triticale, rape and tobacco tissue cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 35:131-139.
- Pumhauser L, **Gyulai G**, M Csősz, L Heszky, Á Mesterházy (2000a) Identification of leaf rust resistance genes in common wheat by molecular markers. *Acta Phytopathol Entomol Hung* 35:31-36.
- Pumhauser L., **Gyulai G**, Tar M, Csősz M, Mesterházy A, Heszky L (2000b) Use of Molecular Markers in Wheat Breeding for Disease Resistance. In: Eds. I. Fendrik, M del Gallo, J Vanderleyden, M. de Zamaroczy. NATO ASI Series, Vol G37. pp. 155-159. Use of Agriculturally Important Genes in Biotechnology, pp.52-57. IOS Press (NATO Science Series) Amsterdam, Berlin, Oxford, Tokyo, Washington, D.C).
- Röder MS, V Korzun, K Wendehake, J Plaschke, MH Tixier, P Leroy, MW Ganal (1998) A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149:2007-2023.
- Rozen S, Skaletsky HJ (1997) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, (eds: Krawetz S, and Misener S), pp. 365-386. Totowa, NJ: Humana Press. program (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)
- Sági L, Barnabás B (1989) Evidence for cytoplasmic control of in vitro microspore embryogenesis in the anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) *Theor Appl Genet* 78: 867-872.
- Schulman AH, Kalendar R (2005) A movable feast: Diverse retrotransposons and their contribution to barley genome dynamics. *Cytogenetic and Genome Research* 110: 598-605.
- Schoot van der J, Pospikova M, Vosman B, Smulders MJM (2000) Development and characterization of microsatellite markers in black poplar (*Populus nigra* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 101:317-322.
- Simon L (2004) Fitoremedáció. *Környezetvédelmi Füzetek*. BMKE OMIKK, Budapest.
- Smulders MJM, Van der Schoot J, Arens P, Vosman B (2001) Trinucleotide repeat microsatellite markers for black poplar (*Populus nigra* L.). *Mol Ecol Notes* 1:188.
- Stefanovits P (1981) Talajtan. *Mg. Kiadó*, Budapest. ISBN 963-231-035-7
- Szabó Z (2006) A sárgadinnye (*Cucumis melo*) archeogenetikája: ITS és SSR szekvencia heterogenitás. PhD Tézis, pp. 1-103., témavezető: **Gyulai G**. Gödöllő, Hungary
- Szabó Z, **Gyulai G**, M Humphreys, L Horváth, A Bittsánszky, R Lágler, L Heszky (2005a) Genetic variation of melon (*C. melo*) compared to an extinct landrace from the Middle Ages (Hungary) I. rDNA, SSR and SNP analysis of 47 cultivars. *Euphytica* 146:87-94.
- Szabó Z, **Gyulai G**, L Horváth, A Bittsánszky, Sz Szani, R Lágler, J Kiss, F Gyulai, L Holly and L Heszky (2005b) Genetic diversity of Hungarian melon landraces (*C. melo*) compared to an extinct sample from the Middle Ages. *Hung Agric Res* 2005/2:18-22.
- Szabó Z (2006) A sárgadinnye (*Cucumis melo*) archeogenetikája, ITS- és SSR -heterogenitása egy 15. századi lelettől a mai fajtáig. PhD Disszertáció, SzIE Gödöllő, pp.1-103. témavezető: **Gyulai G**.
- Szabó Z, **Gyulai G**, Lágler R, Tóth Z, Heszky L (2007) SNP elemzés az rDNA ITS1-5.8S-ITS2 lokuszán mai és középkori sárgadinnyében (*Cucumis melo*). *Agrártudományi Közlemények* 27: 120-124.
- Szigeti Z, Rácz I, László D (2001) Paraquat resistance of weeds – the case of *Conyza canadensis* (L.) Cronq., Z. *Naturforsch.* 65c, 319-328.
- Tar M, L Pumhauser, L Csosz, A Mesterházy, **Gyulai G** (2002) Identification of molecular markers for an efficient leaf rust resistance gene (Lr 29) in wheat. In: *Proceedings of the 7th Hungarian Congress on plant Physiology*, 2002. *Acta Biol Szegediensis* 46(3–4): 133–134.
- Tárczy HM, **Gyulai G**, Janovszky J, Kiss E, Heszky LE (1996) Cytogenetic instability among the vegetative progenies of *A.repens* cv. *Purdue* somaclones. *Cereal Research Communications* 24: 267-273.
- Toldi O, **Gyulai G**, E Preininger, É Várallyay, M Fári (1994) Minibeet initiation of derooted sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) seedlings in vitro. *Plant Sci* 94:217-224.
- Toldi O, **Gyulai G**, J Kiss, IA Tamás, E Balázs (1996) Antiauxin enhanced microshoot initiation and plant regeneration from epicotyl-originated thin-layer explants of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Cell Rep* 15:851-854.
- Tóth Z, **Gyulai G**, Szabó Z, Heszky L (2007) Mikroszatellita lokuszok evolúciója a görögdinnyében (*Citrullus lanatus*) a középkor óta; (CT)₃ deléció a (CT)₂₆ nSSR-ban. *Agrártudományi Közlemények* 27: 125-134.
- Törjék O, E Kiss, J Kiss, M Kondrák, **Gyulai G**, J Gergácz, L Heszky (2001) Evaluation of genetic diversity of poplar genotypes by RAPD and AP-PCR analysis. *Acta Biol Hung* 52:345-354.
- Tseveendorj D, L Sugar (1994) *Hanguk Minjokhak Yon'gu*. In.: The review of Korea Anthropology Institute 2, pp. 91-110., Dankook University, Seoul Korea.
- Várallyay Gy (2005) *Agroökológia – tájékológia. Tájékológiai Lapok*, 3. évf. 1. szám, p. 155-175.
- Vaughan DA, E Balázs, JS Heslop-Harrison (2007) From Crop Domestication to Super-domestication. *Annals of Botany* 100: 893–901.
- Vavilov I.N (1951) *The Origin, Variation, Immunity and Breeding of Cultivated Plants* (K. Starr Chester). 1951. *Chronica Botanica* 13:1–366.; és *Origin and Geography of Cultivated Plants* (fordította Doris Love) (1992). Cambridge University Press, Cambridge. ISBN 0-521-40427-4.
- Velich I (1967) Adatok a *Cucumis melo* L. ivargenetikájához. Doktori Disszertáció, Kertészeti és Szőlészeti Főiskola, Budapest.
- Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS (1997) Viable Offspring Derived from Fetal and Adult Mammalian Cells. *Nature* 385:810-813.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.
- Zsoldos F, Vashegyi Á, Pécsvárad A, Bóna L (2003) Influence of silicon on aluminium toxicity in common wheat and durum wheat. *Agronomie* 23: 349-354.

6. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

(a) Könyv/részlet (7)

1. **Gyulai G**, Z Tóth, A Bittsánszky, Z Szabó, G Gullner, J Kiss, T Kőmíves and L Heszky (2008) Gene up-regulation by DNA demethylation in 35S-*gshI*-transgenic poplars (*Populus x canescens*). in: Genetically Modified Plants: New Research Trends. Eds. T Wolf and J Koch, *Nova Science Publisher*, Inc. USA, Chapter 8, pp. 173-191. ISBN 978-1-60456-696-3.
2. **Gyulai G**, Kiss E, Heszky L (2004) Az árpa biotechnológiája. in Magyarország kultúrflórája. VIII/14. pp. 274-289. (Eds.) L. Tomcsányi, G Turcsányi. Az árpa - *Hordeum vulgare* L., Akadémiai Kiadó, Budapest. ISBN 963 05 8100 0.
3. **Gyulai G**, E Kiss, LE Heszky (1993) A repce biotechnológiája. in Magyarország Kultúrflórája. VI. ed. Szabó L. Az olajrepce - *Brassica napus*. pp. 56-62. Akadémiai Kiadó, Budapest. ISBN. 963 05 6591 9.
4. **Gyulai G**, L Murenyetz, J Janovszky, M Tárcezi, I Rácz (1995) Initiation of monocot plant development In vitro for studying plant-microbe interaction. In *Azospirillum* VI. and related microorganisms. Ed. I. Fendrik et al. NATO ASI Series, Vol G37. pp. 155-159. *Springer-V* Berlin Heidelberg. ISBN 3-540-60107-4.
5. Kiss E, **Gyulai G**, Heszky L (2004) Az árpa genetikája. in Magyarország kultúrflórája. VIII./14. pp. 256-273. (Eds.) L. Tomcsányi, G Turcsányi. Az árpa - *Hordeum vulgare* L., Akadémiai Kiadó, Budapest. ISBN 963 05 8100 0.
6. Jekkel Z, **Gyulai G**, LE Heszky (1995) Cryopreservation of some halophyte grasses (*Puccinellia* species). In. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 32., Cryopreservation of plant germplasm I. ed. Y.S.P. Bajaj, Springer V, Berlin-New York, pp. 245-255.
7. Jekkel Zs, J Kiss, **Gyulai G**, E Kiss, L Heszky (2002) Cryopreservation of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.). in. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.50., Cryopreservation of plant germplasm II. ed. Y.S.P. Bajaj, Springer V, Berlin-New York, pp.192-212. ISBN. 978-354057-451-4.

(b) IF közlemények (21)

1. **Gyulai G**, M Humphreys, R Lagler, Z Szabó, Z Toth, A Bittsánszky, F Gyulai and L Heszky (2006) Seed remains of common millet from the 4th (Mongolia) and 15th (Hungary) centuries; AFLP, SSR, and mtDNA sequence recoveries. *Seed Science Research* 16:179-191. (IF: 1.892)
2. **Gyulai G**, M. Humphreys, A. Bittsánszky, K. Sköt, J. Kiss, L. Sköt, G. Gullner, S. Heywood, Z. Szabó, A. Lovatt, L. Radimsky, H. Roderick, M. Abberton, H. Rennenberg, T. Kőmíves, L. Heszky (2005) AFLP analysis and improved phytoextraction capacity of transgenic *gshI*-poplar clones (*Populus canescens* L.) in vitro. *Z. Naturforschung* 60c (3/4), 300-306. (IF: 0,798)
3. **Gyulai G**, Z Mester, J Kiss, Szemán L, Heszky L, A Idnurm (2003) Somaclone breeding of reed canarygrass (*Phalaris arundinacea* L.). *Grass and Forage Sciences* 58:210-215. (IF: 0.618)
4. **Gyulai G**, Gémesné JA, Zs Sági, G Venczel, P Pintér, Z Kristóf, O Törjék, L Heszky, S Bottka, J Kiss, L Zatykó (2000) Doubled haploid development and PCR-analysis of F₁ hybrid derived DH-R₂ paprika (*Capsicum annuum* L.) lines. *J Plant Physiol* 156:168-174. (IF: 1,403)
5. **Gyulai G**, Z Jekkel, E Kiss, J Kiss, L E Heszky (1995) A selective auxin and cytokinin bioassay based on root and shoot formation in vitro. *J Plant Physiol* 145: 379-382. (IF: 1,403)
6. **Gyulai G**, E Kiss, A Csillag, LE Heszky (1993) Developmental analysis of primary and secondary somatic embryogenesis in soybean tissue culture. *Acta Biol Hung* 44:189-196. (IF: 0,636)
7. Szabó, Z., **Gyulai G**, M. Humphreys, L. Horváth, A. Bittsánszky, R. Lágler, L. Heszky (2005) Genetic variation of melon (*C. melo*) compared to an extinct landrace from the Middle Ages (Hungary) I. rDNA, SSR and SNP analysis of 47 cultivars. *Euphytica*, 146, 87-94. (IF: 0,884)
8. Lágler R, **Gyulai G**, M Humphreys, Z Szabó, L Horváth, A Bittsánszky, J Kiss, L Holly, L Heszky (2005) Morphological and molecular analysis of common millet (*P. miliaceum*) cultivars compared to an aDNA sample from the 15th century (Hungary). *Euphytica*, 146, 77-85. (IF: 0,884)
9. Gullner G, **Gyulai G**, A Bittsánszky, J Kiss, L Heszky, T Komíves (2005) Enhanced inducibility of glutathione S-transferase activity by paraquat in poplar leaf discs in the presence of sucrose. *Phyton*, 45 (3):39-44. (IF: 0,348)
10. Jekkel Zs, **Gyulai G**, J Kiss, E Kiss, L Heszky (1998) Cryopreservation of horse-chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) somatic embryos using three different freezing methods. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 52:193-197. (IF: 1,028)
11. Toldi O, **Gyulai G**, J Kiss, IA Tamás, E Balázs (1996) Antiauxin enhanced microshoot initiation and plant regeneration from epicotyl-oroginated thin-layer explants of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Cell Rep* 15:851-854. (IF: 2,173)
12. Toldi O, **Gyulai G**, E Preininger, É Várallyay, M Fári (1994) Mini-beet initiation of derooted sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) seedlings in vitro. *Plant Sci* 94:217-224. (IF: 1.605)
13. Tárcezy HM, **Gyulai G**, J Janovszky, E Kiss, LE Heszky (1996): Cytogenetic instability among the vegetative progenies of *A. repens* cv. Purdue somaclones. *Cereal Res Comm* 24:267-273. (IF: 0.320)
14. Purnhauser L, **Gyulai G** (1993) The effect of copper on the shoot and root regeneration in wheat, triticale, rape and tobacco tissue cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 35:131-139. (IF: 1,113)
15. Kiss E, J Kiss, **Gyulai G**, LE Heszky (1994) A novel method for rapid micropropagation of pineapple. *Hort Sci* 30:127-129. (IF: 0.574)
16. Bittsánszky A, **Gyulai G**, M Humphreys, Gullner G, Csintalan Z, Kiss J, Szabó Z, Lágler R., Tóth Z, H Rennenberg, Heszky L, Kőmíves T (2006) RT-PCR analysis and stress response capacity of transgenic *gshI*-Poplar clones (*Populus x canescens*) in response to paraquat exposure. *Z. Naturforschung*, 61c: 699-703. (IF: 0,798)
17. Mázik TK, L Lelley, **Gyulai G**, E Kiss, L Heszky (1997) Meiotic and RAPD analysis of a new genotype of *Agropyron repens* L. *Cereal Res Comm* 25:127-133. (IF: 0.320)
18. Bayar K, O Törjék, E Kiss, **Gyulai G**, L Heszky (2002) Intra and interspecific molecular polymorphism of thrips species. *Acta Biol Hung* 53:317-324. (IF: 0,636)

19. Bittsánszky A, T Kőmives, G Gullner, **Gyulai G**, J. Kiss, L. Heszky, L. Radimszky, H. Rennenberg (2005) Ability of transgenic poplars with elevated glutathione content to tolerate Zinc (2+) stress. *Environment International* 31: 251-254. (IF: 2,856)
20. Törjék O, E Kiss, J Kiss, M Kondrák, **Gyulai G**, J Gergács, L Heszky (2001) Evaluation of genetic diversity of poplar genotypes by RAPD and AP-PCR analysis. *Acta Biol Hung* 52:345-354. (IF: 0,636)
21. Kiss J, M Kondrák, O Törjék, E Kiss, **Gyulai G**, K Mázik-Tőkei, L Heszky (2001) Morphological and RAPD analysis of poplar trees of another culture origin. *Euphytica* 118:213-221. (IF: 0,884)

(c) Konferencia kötet világnyelven (24)

1. **Gyulai G**, M Humphreys, A Bittsánszky, K Sköt, J Kiss, L Sköt, G Gullner, S Heywood, Z Szabo, A Lovatt, L Radimszky, H Roderick, M Abberton, R Lagler, H Rennenberg, T Komives, L Heszky (2004) Clonal propagation and improved phytoextraction activity of *Populus canadensis* poplar clones (*Populus canadensis*) in vitro. In: J Vollmann et al. (Eds) Genetic variation for plant breeding, pp.279-283. The 17th Eucarpia General Meeting, 8-11, September, Tulln, Austria, ISBN 3-900962-56-1.
2. **Gyulai G**, K Bayar, O Törjék, E Kiss, J Kiss, Z Szabó, L Heszky (2001) Molecular polymorphism among populations of *Frankliniella intonsa*. Thrips and Tospoviruses Proceedings of the 7th International Symposium on *Thysanoptera*. pp.373-375.
3. **Gyulai G**, L Szemán, A Idnurm, L Heszky, J Janovszky (2000) Fibre content analysis of reed canary grass (*Phalaris arundinacea* L.) somaclones. In: Soegaard K et al. (eds) Grassland Science in Europe, EGF, Vol.5, pp. 244-246. ISBN 8788976459
4. **Gyulai G** (1999) Biotechnológiai növénynevelés, biológiai alapok. In: Training for EU Accession to the Hungarian Agroadministration, TEMPUS 13321-98. Chapter IV. pp.1-34.
5. **Gyulai G**, I Dweikat, J Janovszky, H Ohm, E Kiss, H Sharma, LE Heszky (1997) Application of ISSR/SSR-PCR for genome analysis of *Agropyron*, *Bromus*, and *Agropyron x Bromus*. In: Z.Staszewski, W Mlyniec, R Osinski (eds) *Ecological aspects of breeding fodder crops and amenity grasses*, PBAI, Radzikow, Poland, pp.306-312.
6. **Gyulai G**, I Dweikat, J Janovszky, H Ohm, E Kiss, H Sharma, LE Heszky (1997) Application of ISSR/SSR-PCR for genome analysis of *Agropyron*, *Bromus*, and *Agropyron x Bromus*. In: Z.Staszewski, W Mlyniec, R Osinski (eds) *Ecological aspects of breeding fodder crops and amenity grasses, Proceedings of the 20th Eucarpia Section Meeting*. PBAI, Radzikow, Poland, pp.306-312.
7. **Gyulai G**, H Ohm, I Dweikat, H Sharma, J Janovszky, L Heszky (1997) SSR and RAPD analysis of a new *Agropyron* repens genotype. *18th Int. Grassland Congress*, Winnipeg, Canada, pp 4/69 - 70.
8. **Gyulai G**, S Bottka, J Marticsek, G Baskay, E Kiss, J Janovszky, O Gyulavári, L Heszky (1997) SSR-PCR analysis of lignin-deficient maize mutant of SzV-293/bmr-1. *Application of Marker Aided selection in Cereal Breeding Programs. Book of Abstracts, EUCARPIA - Section Cereals Meeting*, Sept.22-23, eds. H Buersimayer, P Ruckebauer, pp. 77-79. Tulln, Austria.
9. **Gyulai G**, M Strnad, E Kiss, IA Tamas, LE Heszky (1996) Plant growth regulators: auxins and cytokinins. The *2nd Brazilian-Hungarian Seminar and Training Course in Plant Biotechnology*, Budapest, Hungary, pp.51-63.
10. **Gyulai G**, L Murenietz, J Janovszky, TM Hangyel, E Kiss, RI Szabó, LE Heszky (1996) Somatic embryogenesis of monocot and dicot plants. The *2nd Brazilian-Hungarian Seminar and Training Course in Plant Biotechnology*, Budapest, Hungary, pp.64-78.
11. **Gyulai G**, L. Murenietz J Janovszky, MH Tárcezi, M. Tőkei, LE Heszky (1994) Monocot plant biotechnology in higher education. In: *Proceedings of second European conference on higher education in Agriculture*, ed. Ángyán et al., Gödöllő, pp. 383-386.
12. Szabó Z, **Gyulai G**, M Humphreys, A Bittsánszky, F Gyulai, R Lagler, J Kiss, L Horvath, L Heszky (2004) aDNA analysis of cantaloupe (*Cucumis melo* L) from the Middle Ages compared to modern varieties. In: J Vollmann, H. Grausgruber, P. Ruckebauer (Eds) Genetic variation for plant breeding, pp.97-101. The 17th Eucarpia General Meeting, 8-11, September, Tulln, Austria, ISBN 3-900962-56-1.
13. Lagler R, **Gyulai G**, M Humphreys, Z Szabo, S Heywood, F Gyulai, L Sköt, L Horvath, K Sköt, A Lovatt, H Roderick, M Abberton, L Heszky (2004) DNA recovery and AFLP analysis of common millet (*Panicum miliaceum* L.) from the 4th and 15th centuries compared to a current variety 'Topaz'. In: J Vollmann, H. Grausgruber, P. Ruckebauer (Eds) *Genetic variation for plant breeding*, pp. 63-66. In: J Vollmann et al. (Eds) Genetic variation for plant breeding, pp.279-283. The 17th Eucarpia General Meeting, 8-11, Sept, Tulln, Austria, ISBN 3-900962-56-1.
14. Kiss E, **Gyulai G**, I Szabó, J Kiss, LE Heszky (1994) In vitro plant differentiation: a model system for laboratory practice. In: *Proceedings of second European conference on higher education in Agriculture*, ed. Ángyán et al., Gödöllő, pp. 391-394.
15. Rady F, **Gyulai G**, E Kiss, N Bucherna, S Radi, LE Heszky (1997) RFLP, RAPD, and SSR-PCR analysis of root selected maize lines and hybrids. *Application of Marker Aided selection in Cereal Breeding Programs. Book of Abstracts, EUCARPIA - Section Cereals Meeting*, Sept.22-23, eds. H Buersimayer, P Ruckebauer, pp. 75-76. Tulln, Austria.
16. Mester Z, **Gyulai G**, J Janovszky, TM Hangyel, M Tar, S Bottka, L Heszky (1998) Development and genetic analysis of new somaclones of Reed Canarygrass (*Phalaris arundinacea* L). In: Nagy G, K Pető (eds) Grassland Science in Europe, Vol.3. pp. 791-794. ISBN 963717782-5.
17. Janovszky J, **Gyulai G**, Zs Mester, M Tar, Gy Baskay, TM Hangyel, Zs Jenei, S Bottka, L Heszky (1998) Genetic analysis and somaclone development of Tall Fescue (*Festuca arundinacea* L.). In: Nagy G, K Pető (eds) Grassland Science in Europe, EGF. Vol.3. pp. 737-739.
18. Purnhauser L, **Gyulai G**, Tar M, Csösz M, Mesterházy A, Heszky L (2000): Use of Molecular Markers in Wheat Breeding for Disease Resistance. In: Hrazdina G. (ed.): Use of Agriculturally Important Genes in Biotechnology, pp.52-57. IOS Press (NATO Science Series) Amsterdam, Berlin, Oxford, Tokyo, Washington, DC).
19. Gémesné JA, **Gyulai G**, M Petus, G Venczel, Zs Sági, L Zatykó (2000) DH-breeding of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). Biotechnological approaches for utilization of gametic cells.(ed. B. Bohanec). COST Action 824, pp.157-159. ISBN 92-894-0225-3.

20. Bittsánszky A, **Gyulai G**, M Humphreys, J Kiss, Zs Csintalan, R Lagler, Z Szabo, G Gullner, H Rennenberg, T Komives, L Heszky (2004) Stress capacity and RT-PCR analysis of transgenic *gshI* poplar clones (*P. canescens*) in response to paraquat exposure. In: J Vollmann, H. Grausgruber, P. Ruckebauer (Eds) Genetic variation for plant breeding, pp.273-277. The 17th Eucarpia General Meeting, 8-11, September, Tulln, Austria, ISBN 3-900962-56-1.
21. Kiss E, O Törjék, **Gyulai G**, Z Kertész, J Pauk, S Bottka, LE Heszky (1997) Comparison of doubled haploid wheat lines by RAPD and SSR analysis. *Application of Marker Aided selection in Cereal Breeding Programs. Book of Abstracts, EUCARPIA - Section Cereals Meeting*, Sept.22-23, eds. H Buersimayer, P Ruckebauer, pp. 46. Tulln, Austria.
22. Heszky L, Kiss J, **Gyulai G**, Kiss E, H-Novák M, T-Lőkös K, M-Tőkei K, Jekkel Zs (1996) Aspects of morphogenesis in tissue culture of crop plants. *Bull. Univ. Agric.Sci.*, 1995/96, pp.71-82, Gödöllő.
23. Bayar K, O Törjék, E Kiss, **Gyulai G**, L Heszky (2001) Genetic variation within and among populations of Aeolothrips intermedius. Thrips and Tospoviruses Proceedings of the 7th International Symposium on *Thysanoptera*. pp.369-372.
24. Bittsánszky A, Kőmives T, G Gullner, **Gyulai G**, J Kiss, Heszky L, L Radimsky, H Rennenberg (2003) Ability of transgenic poplars with elevated glutathione content to tolerate Zinc (2+) stress. 2nd European Bioremediation Conference, Greece, Jun30-July4, pp. 349-352.

(d) IF-el nem rendelkező tudomány közlemények (17)

1. **Gyulai G** (2007) DHAC-indukált DNS-demetiláció és transzgén-reaktiváció *gshI*-transzformáns szürkenyár (*Populus x canescens*) klónokban; génkompetíció qRT-PCR elemzése. *Agrártud Közl* 27: 78-83.
2. **Gyulai G**, JA Gémesné, Zs Sági, L Zatykó, L Heszky, G Venczel (1999) PCR analysis of F₁ hybrid derived DH pepper lines. *Capsicum and Eggplant Newsletters* 18: 40-43.
3. **Gyulai G**, E Kiss, J Kiss, LE Heszky (1993) Hormone-Selective Bioassay for Auxins and Cytokinins in vitro. *Hung Agric Res* 2:13-17.
4. Tóth Z, **Gyulai G**, Horváth L, Szabó Z, Heszky L (2007) Mikroszatellita lokuszok evolúciója a görögdinnyében (*Citrullus lanatus*) a középkor óta; (CT)₃ delécio a (CT)₂₆ nSSR-ban. *Agrártud Közl* 27: 125-134.
5. Szabó Z, **Gyulai G**, Tóth Z, Heszky L (2007) A sárgadinnye (*Cucumis melo*) sejtmagi mikroszatellita lokuszainak evolúciója a középkor óta. *Agrártud Közl* 27: 120-124.
6. Szabó Z, **Gyulai G**, L Horváth, A Bittsánszky, Sz Szani, R Lágler, J Kiss, F Gyulai, L Holly and L Heszky (2005) Genetic diversity of Hungarian melon landraces (*C. melo*) compared to an extinct sample from the Middle Ages. *Hung Agric Res* 2005/2:18-22.
7. Lágler R, **Gyulai G**, Tóth Z, Szabó Z, Horváth L, Heszky L (2007) A köles (*Panicum miliaceum*) SSR- és ISSR szekvencia-stabilitása a középkortól napjainkig. *Agrártud Közl* 27: 10-19.
8. Lágler R, **Gyulai G**, Z Szabó, Z Tóth, A Bittsánszky, L Horváth, J Kiss, F Gyulai, L Heszky (2006) Molecular diversity of common millet (*P. miliaceum*) compared to archaeological samples excavated from the 4th and 15th centuries. *Hung Agric Res* 2006/1:14-19.
9. Horváth L, **Gyulai G**, Szabó Z, Tóth Z, Heszky L (2007) Morfológiai diverzitás sárgadinnyében (*Cucumis melo*); egy középkori típus fajtarekonstrukciója. *Agrártud Közl Debrecen* 27: 84-90.
10. Bittsánszky A, **Gyulai G**, Kiss J, Gullner G, Heszky L, Kőmives T (2007) Feketenyár (*Populus nigra*) gametoklónok mikroszatellita diverzitása; (TTCTGG)₅ delécio a WPMS-20 lokuszon. *Agrártud Közl* 27: 60-67.
11. Bittsánszky A, **Gyulai G**, L Gajdos, Z Szabó, JA Gémesné, J Kiss, R Lagler, L Heszky (2006) Genotype identification of onion (*Allium cepa* L) cultivars. *Acta Hort.* 725:699-702.
12. Bittsánszky A, **Gyulai G**, RP Malone, G Gullner, J Kiss, M Czákó, P Lehoczky, L Márton, L Heszky, T Kőmives (2007) Triggering of a plant molecular defense mechanism; gene expression levels of transgene *gshI* and poplar gene *gshI* (*Populus x canescens*) in response to the DNA demethylating drug DHAC – an qRT-PCR analysis. *Acta Phytopathol Entomol Hung* 42:235-243.
13. Bittsánszky A, **Gyulai G**, G Gullner, J. Kiss, Zs Csintalan, Z Szabó, R Lágler, T Kőmives (2005) Stress tolerance and in vitro phytoremediation of poplar (*Populus*). *Hung Agric Res* 2005/1:13-15.
14. Kiss J, O Törjék, A Bittsánszky, **Gyulai G**, K Mázik-Tőkei, E Kiss, LE Heszky (2003) Analysis of phenotypic and molecular characteristics of anther culture derived poplar trees. *Bull. St Stephanus University* 2003: 15-27.
15. Sharma H, Francki M, Crasta O, **Gyulai G**, Bucholtz D, Ohm H, Anderson J, Perry K, and Patterson F. (1999) Cytological and molecular characterization of wheat lines with Thinopyrum intermedium chromosome additions, substitutions and translocations resistant to barley yellow dwarf virus. *Cytologia* 64:93-100.
16. Hangyelné TM, J Janovszky, E Kiss, **Gyulai G** (1996): Szomaklónális kromoszóma variabilitás jellemzése az *Agropyron* cv. szomaklónok vegetatív utódaiban. *Növénytemelés* 45:109-115.
17. Gémesné JA, M Petus, G Venczel, L Zatykó, **Gyulai G**, M Cséplő (2001) Genetic variability of anther donor versus spontaneous doubled haploid descendents and colchicine induced doubled haploid sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) lines. *Acta Hort* 560:149-152.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton emlékezem Prof. Dr. Heszký László akadémikus, Intézetvezető Úrnak, az MTA Doktori Disszertációm, valamint a Biológiai Tudományok Kandidátusa fokozatért megvédett disszertációm (1993) elkészítésében nyújtott támogatására.

Tanítványi tisztelettel köszönöm Prof. Dr. Lehoczki Endre tanár Úrnak az egyetemi Doktori Disszertációm témavezetését.

Gratulációval emlékezem Dr. Szabó Zoltán, Dr. Bittsánszky András, Lágler Richárd és Tóth Zoltán PhD tanítványaimra, az együtt végzett friss szellemű kutatásokért és tudományos eredményekért. Ezúton emlékezem a korábbi doktoranduszaimmal és MSc hallgatóimmal (1-44) elért kutatási eredményeinkre.

Külföldi tanulmányútaim tapasztalataiért és tudományos eredményeiért Prof. Alan Schulman (Helsinki Egyetem, Fi); Prof. Fenny Dane és Prof. Luther Waters (Auburn Egyetemen, USA); Prof. Mervyn Humphreys (IGER, UK); Prof. Marion Röder és Prof. U. Wobus (IPK, Gatersleben, D); Prof. Herb Ohm (Purdue Egyetem, USA); Prof. Sacco de Vries (Wageningen Egyetem, Ne); és Prof. Carlos Boroto (Siego de Avilla-i Egyetemen, Kuba) kutatói és előadói meghívásaira emlékezem.

A hazai laboratóriumokkal végzett közös kutatásokért Prof. Dudits Dénes (MTA SzBK), Prof. Dr. Barnabás Beáta (MTA Martonvásár), Prof. Dr. Márton László (MTA SzBK), Prof. Kőmíves Tamás (MTA, NKI); és Prof. Hornok László (SzIE, MBK) szíves együttműködését köszönöm. Habilitációmban nyújtott szíves közreműködéséért Prof. Dohy Jánost és Prof. Várallyay György figyelmességét köszönöm.

Köszönetet mondok egyetemi (SzIE, korábban GATE) és intézeti (Genetika és Biotechnológiai Intézet, korábban Genetika és Növénynemesítés Tanszék) kollegáimnak a negyedszázados töretlen együttműködésért.

Ezúton emlékezem meg a Magyar Tudományos Közélet és az MTA alapítványaira és kuratóriumaira (Széchenyi Professzori Ösztöndíj, Széchenyi István Ösztöndíj, MTA-kutatói ösztöndíj, OTKA, Fulbright, GVOP, FVM, NKFP), hogy kutatásaim finanszírozásával lehetővé tették a tudományos eredmények elérését.

Gödöllő, 2007. szeptember 15.

Gyulai Gábor